

THESIS

MARBURG

1966

Aus der Frauenklinik der Philipps-Universität Marburg/Lahn
damaliger Direktor: Professor Dr. H. Huber

**Enzymaktivitätsmuster
des energieliefernden Stoffwechsels
von Skelett- und Uterusmuskulatur
des Menschen**
(Ein Beitrag zur vergleichenden Biochemie)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Eberhard Henkel
aus Marburg/Lahn

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus der Frauenklinik der Philipps-Universität Marburg/Lahn
damaliger Direktor: Professor Dr. H. Huber

**Enzymaktivitätsmuster
des energieliefernden Stoffwechsels
von Skelett- und Uterusmuskulatur
des Menschen**
(Ein Beitrag zur vergleichenden Biochemie)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Eberhard Henkel
aus Marburg/Lahn

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Philipps Universität zu Marburg am : 13.12.1966
Gedruckt mit der Genehmigung der Fakultät
Dekan: Professor Dr. Dr. H. Heuser
Referent: Privat-Dozent Dr. W. Luh
Correferent: Professor Dr. W. Schmid

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Die glatte Muskelzelle	1
Die quergestreifte Muskelzelle	2
Verteilung von Muskulatur und Bindegewebe	3
Erregungsvorgänge	4
Die kontraktilen Proteine	6
Aktin	6
Myosin	6
Actomyosin	7
Tropomyosin	10
Die energiereichen Phosphate	11
Problemstellung	12
Material und Methode	14
Untersuchungsmaterial	14
Extraktionsverfahren	14
Prinzip	14
Extraktion	15
Proteingehalt	16
Proteinbestimmung	16
Enzymaktivitätsbestimmung im optischen Test	16
Berechnung der Enzymaktivitäten	18
Verzeichnis der Abkürzungen	20
Testzusammensetzungen	21
Ergebnisse	27
Proteinwerte	27
Enzymaktivitäten	31
Extraktionsverhalten und cytologische Zuordnung	33
Diskussion	42
Vergleichende Betrachtung zum Kohlenhydratstoffwechsel der Muskulatur	42
Emden-Meyerhof-Weg	42
Phospho-Triose-Glycerat-Gruppe	44
Hexokinase	45
Phosphoglucose-Mutase	46
Pentosephosphat-Cyclus	47
Glyceraphosphat-Cyclus	50
Glutamat-Dehydrogenase und Transaminasen	51
Citrat-Cyclus	52
Malic Enzyme	55
Phosphokreatin-Kinase und Myokinase	57
Schlußbemerkung	60
Zusammenfassung	61
Literaturverzeichnis	64



Digitized by the Internet Archive
in 2026

E i n l e i t u n g

In vergleichenden enzymologischen Studien an der Muskulatur der afrikanischen Wanderheuschrecke konnte durch den BÜCHER'schen Arbeitskreis(VOGELL, BISHAI, BÜCHER, KLINGENBERG, PETTE und ZEBE 1959; DELBRÜCK, ZEBE und BÜCHER 1959; BROSEMER, VOGELL und BÜCHER 1963) die funktionsgemäße Differenzierung des Enzymverteilungsmusters zur Morphologie erstmalig herausgestellt werden. Es ist naheliegend, nach dieser Erkenntnis auch an menschlicher Muskulatur entsprechende Untersuchungen durchzuführen. Die Fragestellung dieser Arbeit ist, in wie weit die menschliche Uterusmuskulatur eine spezifische Differenzierung aufweist. Zum Vergleich soll die Skelettmuskulatur des Menschen herangezogen werden. Aus zahlreichen Studien über Anatomie, Physiologie und Biochemie ist bekannt, daß diese beiden Muskeltypen hinsichtlich ihrer Funktion wesentliche Unterschiede aufweisen. Um die Problematik klarer darzustellen, ist es erforderlich, einige der bekannten morphologischen und funktionellen Unterschiede aufzuzeichnen.

Die glatte Muskelzelle

Die glatte Muskulatur setzt sich aus 15 - 20 μ langen spindelförmigen Zellen zusammen, die im graviden Uterus eine Länge von 500 μ erreichen können. Die Zellquerschnitte sind rund, ovoid oder polygonal mit einem Durchmesser von 4 - 7 μ . Jede Zelle wird von einer Membran, dem Sarkolemm umgeben. Die Membran hat neben der Aufgabe, die Zelle gegen den Interzellularraum abzugrenzen noch eine Funktion bei der Übertragung der intrazellulär erzeugten Kraft auf das die Zelle umgebende Bindegewebe.

Die ellipsoiden Kerne liegen an der Stelle des größten Durchmessers der Zelle. Auffällig ist im mikroskopischen

Bild die geringe Anzahl an Kernen. Jeder Kern enthält mehrere Nucleoli und ein blasses Chromatinnetz an der Innenseite der Kernmembran; unmittelbar neben dem Kern liegt das Dipsom; an einem der Kernpole ist der Golgiapparat angelagert. Die Mitochondrien sammeln sich im allgemeinen in der Nähe der Kernoberfläche.

Die glatten Muskelzellen stehen mit dem Bindegewebsfasern, die sie miteinander verbinden, in engem Kontakt. In diesem Punkt ähneln sich glatte und quergestreifte Muskulatur. Im Gegensatz dazu sind aber bei der glatten Muskulatur die kontraktilen Elemente nicht in einer charakteristischen Anordnung zusammengefaßt, aus der man Rückschlüsse auf die Funktion ziehen kann. Man sieht sehr zarte, strukturelose, doppelbrechende Proteinfäden von weniger als $1\ \mu$ Durchmesser parallel zur Längsachse verlaufend angeordnet, die die Hauptmasse des Cytoplasmas ausmachen. Sie liegen bei lichtmikroskopischer Betrachtung an der Grenze der Sichtbarkeit. Elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, daß jede Myofibrille aus 100 - 200 feinsten Proteinfäden, den Myofilamenten aufgebaut ist. Im Gegensatz zur periodischen Gliederung der Fibrillen der Skelettmuskulatur, die ein unterschiedliches optisches Verhalten zeigen, sind die Fibrillen der glatten Muskelzelle durchgehend einachsigt positiv doppelbrechend. Diese einheitliche Struktur der Myofibrillen führte zur Benennung ' glatte ' Muskelzelle.

Die quergestreifte Muskelzelle

Die isolierte Muskelzelle ist meist rund und läuft in kegelförmige Enden aus. Die Länge der Einzelfasern schwankt von wenigen Millimetern (M. tensor tympani) bis zu 52 cm als längste Fasern im M. sartorius. Entsprechend schwankt der Durchmesser zwischen 9 und $100\ \mu$ (im Mittel 40 - $60\ \mu$) Im Muskelquerschnitt sieht man zahlreiche stäbchenförmige Kerne, die unmittelbar unter dem Sarkolemm gelegen sind.

Die charakteristische Querstreifung der Skelettmuskulatur ist Ausdruck des geordneten Gefüges der kontraktilen Fibrillen, die in das Cytoplasma der Fasern eingebettet sind. Die Fibrillen sind wiederum in Filamente unterteilt, deren charakteristische Anordnung die regelmäßige Folge von isotropen und anisotropen Bändern bedingt, die senkrecht zur Faserrichtung verlaufen. Die Folge der sich wiederholenden Querstreifung bezeichnet man als Sarkomer; es stellt das Funktionselement des quergestreiften Muskels dar. Ein Sarkomer wird durch die Z-Linien begrenzt, eine Art Septum, welches ohne Unterbrechung quer durch die Fibrille verläuft. Die querverlaufenden hellen und dunklen Bänder der Muskelfaser finden sich auch in der einzelnen Fibrille. Im polarisierten Licht sind die dunklen Bänder doppelbrechend und werden als anisotrope oder A-Streifen bezeichnet. Die hellen Zonen sind weniger doppelbrechend, sie werden isotrope oder I-Streifen genannt. In der Mitte der A-Bande verläuft als sehr dünne Linie der M-Streifen. Die I-Bande wird durch die dünne Z-Linie, die ein Sarkomer begrenzt, unterteilt.

Studien über die Feinstruktur der Myofibrillen ergaben die Anwesenheit zweier Arten von Filamenten. In den A-Streifen ist das Protein Myosin lokalisiert, es wird als dickes Filament sichtbar. Die dünneren Aktinfilamente gehen von der Z-Linie aus bis zum äußeren Rand des H-Bandes. Bei der Kontraktion kommt es nach den bestehenden Modellvorstellungen nicht zu einer Verkürzung der Filamente, sondern zu einer Verschiebung ineinander, so daß sich nur die Übergangszonen ändern, d. h. die I-Banden werden kleiner bzw. verschwinden.

Verteilung von Muskulatur und Bindegewebe

Die Auswirkung der Kontraktion auf das umgebende Gewebe beruht auf der strukturellen Verbindung der kontraktilen Substanz mit dem Bindegewebe. Jede Muskelzelle ist von einer röhrenartigen Gitterfaserhülle umgeben, deren Fibril-

len mit der Oberfläche der Muskelzelle in Verbindung stehen. Verformungen des Zelleibes werden so auf das umgebende Bindegewebe übertragen. Die Verteilung von Muskulatur und Bindegewebe ist von der Funktion des Muskels abhängig.

Die an dieser Stelle besonders interessierende Uterusmuskulatur ist im Gegensatz zur quergestreiften Muskulatur sehr bindegewebsreich. Die Verteilung von Muskel- und Bindegewebsfasern schwankt je nach Funktionszustand und ist in den einzelnen Abschnitten des Uterus verschieden. CRETIUS (1958) und DUBRAUSZKY (1962) geben im geschlechtsreifen Uterus folgende Verteilung an: Corpus uteri 45 % Muskelfasern mit einer Abnahme zur Portio hin, die Cervix weist schließlich nur noch 15 % Muskulatur auf. Im Verlauf der Schwangerschaft erfolgt eine Zunahme der Muskelfasermasse insbesondere im Corpus- und Isthmusbereich, so daß im Corpus der Anteil an Muskelfasern auf 60 % ansteigt. Nach der Menopause entwickelt sich die senile Atrophie, besonders im Bereich des Corpus tritt ein Muskelfaserschwund auf, dadurch kommt es zu einer relativen Vermehrung des Bindegewebes.

Erregungsvorgänge

Die Erregungsleitung stellt einen anderen Parameter der Muskelfunktion dar, in dem Differenzen zwischen glatter und quergestreifter Muskulatur zum Ausdruck kommen. Wie bisher bekannt ist, erfolgt die Erregungsleitung unter bestimmten Voraussetzungen. Für eine Erregung sind die Zelle mit ihrer biologisch aktiven Membran, Ionen, insbesondere Na^+ , K^+ und Cl^- sowie Flüssigkeit im intra- und extrazellulären Raum erforderlich (JUNG 1958). Die semipermeable Membran kann von den verschiedenen Ionen unterschiedlich gut durchdrungen werden. K^+ -Ionen wandern in beiden Richtungen leicht durch die Zellwand, während Na^+ -Ionen die Membran kaum passieren können.

HODGKIN und KATZ (1949) geben folgende Permeabilitätskonstanten an:

$$P_{K^+} : P_{Na^+} : P_{Cl^-} = 1 : 0,04 : 0,45$$

Unter Einsatz von Energie besteht ein ständiger aktiver Kaliumtransport in die Zelle, da durch Diffusion von Kaliumionen außen an der Zellmembran ein Ladungsüberschuß entsteht. Diese 'Kaliumpumpe' sorgt ständig für eine hohe Kaliumkonzentration in der Zelle, während die 'Natriumpumpe' die nach innen gelangten Natriumionen aus der Zelle in den extrazellulären Raum befördert (HODGKIN and KEYNES 1954 ; KEYNES 1951; BORN and BÜLBRING 1956).

Im Zustand der Erregung wird die Durchlässigkeit der Membran für Natriumionen um das 500-fache gesteigert (HODGKIN and KATZ 1949), es kommt zu einem plötzlichen Natriumeinstrom in die Zelle, dabei tritt eine Umkehr des Membranpotentials auf. Das Ruhepotential an der Zellmembran zwischen Zellinnerem und Zelläußerem wird aufgehoben, es erfolgt eine kurzfristige Umpolarisation oder 'overshoot', wobei das Membranpotential positiv wird.

Nachdem die Permeabilitätsverhältnisse für den Ruhezustand der Zelle wiederhergestellt sind, werden K^+ -Ionen in die Zelle hinein und Na^+ -Ionen durch aktiven Transport aus der Zelle herausgeschafft. Die 'Natrium- und Kaliumpumpe' funktioniert nur, wenn die Glykolyse ungestört abläuft, da die erforderliche Energie durch die energiereichen Phosphate bereitgestellt wird (BÜLBRING 1961).

Nach Untersuchungen von CRETIUS (1960 und 1961) und CRETIUS und BEYERMANN (1961) bestehen folgende Unterschiede im Elektrolytgehalt des Myometriums und der quergestreiften Muskulatur: Die Uterusmuskulatur enthält mehr Na^+ und Ca^{++} und weniger K^+ und Mg^{++} als die Skelettmuskulatur. Corpus und Cervix unterscheiden sich durch den Na / K - Quotienten

und den Mg / Ca - Quotienten, beide liegen im Corpus höher als in der Cervix.

Auch bei der Elektrolytverteilung treten deutliche Differenzen zwischen Skelett- und Uterusmuskulatur auf.

Die kontraktile Proteine

Von SCHWALM, CRETIVS und LANGE (1955) liegen sehr interessante Untersuchungen über die kontraktile Elemente der Skelett- und Uterusmuskulatur vor. Für den komplexen Vorgang der Kontraktion werden unter anderem die kontraktile Substanz, die Energie für den Kontraktionsvorgang, der auslösende Reiz und die Überleitung des Reizes auf die kontraktile Substanz als Voraussetzungen gefordert.

Die kontraktile Proteine sind intrazellulär gelagert und stellen die Träger der Kontraktion dar. Es handelt sich dabei um die Proteinfilamente der Myofibrillen; in die Gruppe der kontraktile Elemente der Zelle gehören: Aktin, Myosin, Aktomyosin und Tropomyosin.

Das globuläre Aktin (MG 70 000) kann in zwei Formen vorliegen, in der G-Form (globulär) als monomeres oder dimeres Protein tritt es als durchsichtige Lösung auf. In der F-Form (fibrillär) liegt es polymerisiert als fibrilläres, doppelbrechendes Protein mit einem Molekulargewicht von 10^9 vor (SZENT GYÖRGYI 1950). Die Polymerisation wird durch Adenosintriphosphat (ATP) ausgelöst. Das F-Aktin weist bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung eine periodische Regelmäßigkeit auf, die dafür spricht, daß das polymere Aktin das Grundgerüst der Muskelfibrille darstellt.

Myosin als fadenförmiges Protein mit einem Molekulargewicht von 500 000 ist in den A-Banden der Myofibrillen lokalisiert. Seinen chemischen Eigenschaften nach ist es ein Globulin. Lange Zeit verstand man unter Myosin ein Gemisch

aus Aktin und dem heute als Myosin bezeichneten Protein. BANGA und SZENT GYÖRGYI (1941) fanden in Abhängigkeit von der Extraktionszeit ein Myosin A und Myosin B. SCHRAMM und WEBER (1942) wiesen durch Ultrazentrifugation ein L- und S-Myosin (L = leicht, S = schwer) nach. Das S-Myosin entspricht dem B-Myosin und besteht aus den beiden Komponenten Aktin und Myosin. L-Myosin entspricht dem A-Myosin und stellt das nicht an Aktin gebundene Myosin dar. Die hervorstechendste chemische Eigenschaft des Myosins ist die ATPase-Wirkung. Die ATPase-Aktivität ist an das H-Meromyosin, die eigentliche Wirkungsgruppe des Myosins gebunden. Diese Gruppe geht eine Verbindung mit dem Aktin der Muskelzelle ein.

Das B- oder S-Myosin stellt eine Komplexbindung zwischen F-Aktin und Myosin dar und wird Aktomyosin genannt. Im glatten und im quergestreiften Muskel ist Aktomyosin die eigentliche kontraktile Substanz (SZENT GYÖRGYI 1950). WEBER (1934) entwickelte das Fadenmodell und konnte daran den Vorgang der Kontraktion demonstrieren. Behandelt man Muskulatur mit hypotonischen Salzlösungen, so kommt es zu einer Zerstörung der Zellmembran und die Enzyme, Substrate und Coenzyme werden herausgelöst, während die kontraktile Proteine in ihrer Struktur erhalten bleiben. Dieses Modell ist zunächst starr, das heißt Aktin und Myosin liegen in fester Bindung vor. Nach Zugabe von ATP ist das Modell dehnbar, die Bindung zwischen Aktin und Myosin ist aufgehoben. Das freigesetzte Myosin bewirkt eine Spaltung des zugefügten ATPs (ATPase-Wirkung). Mit dieser Spaltung wird eine Schrumpfung des Modells herbeigeführt, es kommt dabei zur Resynthese von Aktomyosin. KUSCHINSKY und TURBA (1950) und JAISLE (1960) bezeichneten dieses Phänomen als Superpräzipitation. HASSELBACH (1965) bestätigte diese Vorgänge am lebenden Muskel.

Betrachtet man das Zusammenwirken der kontraktile Proteine im molekularen Bereich, so wird nach den Modellvorstellungen von H. H. WEBER (1957) das energiereiche Phosphat des ATPs an eine saure Gruppe des Aktins gebunden. Mit

dieser phosphorylierten sauren Gruppe des Aktins können nur SH- und OH-Gruppen des stäbchenförmigen Myosins reagieren, indem der Phosphatrest freigesetzt wird, und es zu einer Verbindung zwischen Aktin- und Myosinfäden kommt. Wird der Austausch gegen eine danebenliegende phenolische OH-Gruppe des Myosins vollzogen, und dann weiter gegen danebenliegende Alkoholgruppen, SH- und OH-Gruppen, so kommt es zu einer Verschiebung der Aktin- und Myosinfäden gegeneinander.

Die kontraktile Proteine aus glatter und quergestreifter Muskulatur sind sich physikalisch weitgehend ähnlich, es bestehen nur quantitative Unterschiede. Das kontraktile System des Uterus entwickelt weniger Spannung, Kontraktion und Erschlaffung erfolgen langsamer. Die Ursache ist in der unterschiedlichen Anordnung der kontraktile Proteine zu suchen. Die oben beschriebene Verteilung der Aktomyosinfäden in der Ultrastruktur ist an der quergestreiften Muskulatur nachgewiesen worden, im glatten Muskel wurden nur Aktinfilamente gefunden. Wahrscheinlich liegt in diesem Muskeltyp das Myosin als Gel zwischen den Aktinfäden (Abb. 1) .

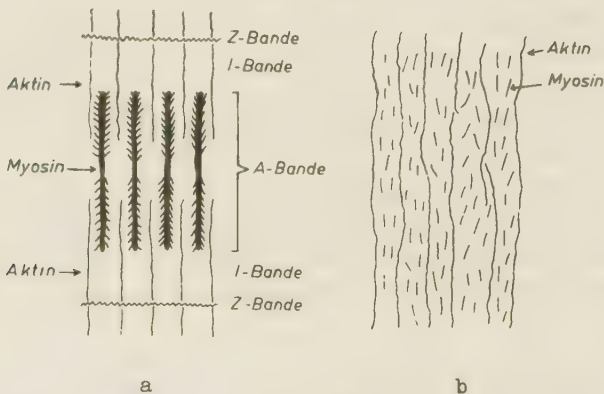


Abb. 1 Verteilung von Aktin und Myosin im Skelettmuskel (a) und glatten Muskel (b) (aus W. HASSELBACH 1965)

Ein weiterer Unterschied besteht im Gehalt an kontraktilen Proteinen. Quergestreifte Muskulatur enthält 100 mg kontraktiles Protein pro g Frischgewicht, nicht-gravider Uterus 3 - 5 mg, gravider Uterus 5 - 8 mg pro g Frischgewicht (HASSELBACH 1965).

Die Aktivität der ATPase-Wirkung der kontraktilen Proteine ist im Uterus ebenfalls niedriger, so daß sich eine 100 - 400 mal kleinere chemische Energieproduktion der Uterusmuskulatur gegenüber der Skelettmuskulatur ergibt. Dieses entspricht der geringeren mechanischen Energieproduktion des Myometriums.

Durch die Abhängigkeit von den Sexualhormonen nimmt die Uterusmuskulatur gegenüber der Skelettmuskulatur eine Sonderstellung ein. Besonders auffällige Veränderungen treten in der Gravidität auf, sie äußern sich anatomisch in einer Zellvermehrung und Zellvergrößerung. Dabei wird auch der Anteil der kontraktilen Proteine vermehrt, Aktomyosin und Myosin nehmen um 50 % je Gewichtseinheit zu. Das Verhältnis Aktomyosin zu Myosin wird zu Gunsten des Aktomyosins verschoben. Am nicht schwangeren Uterus beträgt das Verhältnis 30 % und steigt in der Gravidität auf 60 % an.

An extrahiertem Aktomyosin konnte in der Schwangerschaft eine Zunahme der Kontraktilität (stärkere und raschere Verkürzung) beobachtet werden. CRETIVUS (1957) berichtet in einer ausführlichen Arbeit über den Gehalt an kontraktilen Proteinen in den verschiedenen Funktionszuständen des Myometriums und über Befunde bei primärer Wehenschwäche und ovarieller Dystokie, sowie über Anreicherung der kontraktilen Proteine nach Follikelhormongaben.

Weitere quantitative Befunde von SCHWALM und CRETIVUS (1958) zeigen Unterschiede zwischen glatter und quergestreif-

ter Muskulatur im Gehalt an wasserlöslichen, kontraktilen und Stromaproteinen (Tab. 1)

Tabelle 1 : Proteinfraktionen menschlicher Skelett- und Uterusmuskulatur in mg / g Frischgewicht
(aus SCHWALM und CRETIVS 1958)

	wasserlösl. Protein	kontraktil. Protein	Stroma- Protein	Gesamt- Protein
Skelett- muskulatur	83,9	60,9	48,0	192,8
Corpus uteri	44,4	10,9	115,4	171,7
Cervix uteri	31,8	5,1	164,6	201,5

Ein anderes kontraktils Protein stellt das Tropomyosin dar. Es konnte bisher in zwei Formen nachgewiesen werden, als wasserunlösliches Tropomyosin A und wasserlösliches Tropomyosin B. Mit dem Aktin verbindet es sich zu dem Symplex Aktotropomyosin (MG 62 000) und zeigt gegenüber ATP ein dem Aktomyosin ähnliches Verhalten. Vermutlich spielt das Aktotropomyosin eine Rolle bei der Tonus- und Haltefunktion des Muskels, darunter versteht man die Fähigkeit eines Muskels bei gleichbleibender Länge und Muskelspannung unter geringem Energieverbrauch einen bestimmten Kontraktionszustand aufrechtzuerhalten.

Im Myometrium ist der Anteil an Tropomyosin höher als in der quergestreiften Muskulatur und ist in der Cervix uteri niedriger als im Corpus uteri. Gegen Ende der Gravidität wurde eine Abnahme des Tropomyosingehaltes im Myometrium festgestellt (HASSELBACH und LEDERMAIR 1958 ; NEEDHAM and WILLIAMS 1959 ; JAISLE 1960).

Die energiereichen Phosphate

Die energiereichen Phosphate stellen die Träger der Energie und der Energieübertragung dar und gestatten einen Einblick in die Vorgänge der Energieversorgung, die zum Ablauf einer Kontraktion erforderlich sind.

Die Muskulatur verfügt im wesentlichen über zwei energiereiche Phosphate, die eine schnelle Anpassung an eine hohe Energiebereitstellung erlauben. Es handelt sich hierbei um das Adenosintriphosphat (ATP), welches unmittelbar am Kontraktionsvorgang beteiligt ist und um das Creatinphosphat. Bei Spaltung von ATP in ADP und anorganisches Phosphat wird eine Energie von 11 000 cal / Mol freigesetzt.

Tabelle 2 : Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP) und Creatinphosphat (CP) in glatter und quergestreifter Muskulatur in mMol/kg Gewebe
(aus CRETIUS 1958)

Muskelart	ATP (m Mol/kg Gewebe)	CP (m Mol/kg Gewebe)
Skelettmuskel	5	20
glatter Muskel	2	0,7

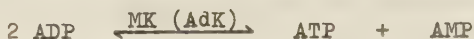
Die Energie für die Kontraktion des Muskels wird durch hydrolytische Spaltung des ATP-Moleküls gewonnen. Creatinphosphat wird zur Rephosphorylierung des ATPs eingesetzt, wodurch ein konstanter ATP-Spiegel in der Zelle gewährleistet ist.

Die Resynthese von Creatinphosphat erfolgt durch rückläufige Reaktion folgender Gleichung



sobald mit Ablauf der Glycolyse ein höherer ATP-Spiegel er-

reicht wird. Durch die Myokinasereaktion steht der Muskelzelle ein weiterer Weg zur ATP-Synthese zur Verfügung, aus zwei Molekülen ADP entsteht ein Molekül ATP und ein Molekül AMP:



Wie aus der Einleitung hervorgeht, werden die funktionellen Unterschiede zwischen quergestreifter und glatter Muskulatur, in diesem Fall zwischen Skelett- und Uterusmuskulatur in den Differenzen des anatomischen Aufbaus, der Erregungsphysiologie und im Verhalten der kontraktilen Proteine und der energiereichen Phosphate deutlich. Es konnte gezeigt werden, daß die Kontraktionsvorgänge als spezifische Funktion der Muskulatur in deutlichem Zusammenhang zur Energiebildung stehen. Die Energiebildung erfolgt im energieliefernden Stoffwechsel.

Die geschilderten Differenzen sollten ebenfalls ihren Ausdruck im unterschiedlichen Verhalten des energieliefernden Stoffwechsels in den einzelnen Muskeltypen finden. Da der Stoffwechsel eines Gewebes eng mit seiner Enzymausstattung oder mit der enzymatischen Struktur verbunden ist, ist zu erwarten, daß diese Differenzierung der Funktion in der Enzymausstattung zum Ausdruck kommt.

Wie eingangs schon erwähnt wurde, konnten Beziehungen zwischen Morphologie und enzymatischer Struktur erstmalig durch den BÜCHER'schen Arbeitskreis am Flugmuskel der afrikanischen Wanderheuschrecke aufgezeigt werden (DEIBRÜCK, ZEBE und BÜCHER 1959 ; VOGELL et al. 1959 ; BROSEMER, VOGELL und BÜCHER 1963) (LUH 1965 am menschlichen Endometrium)

Die bisherigen Untersuchungen über die Enzymausstattung des menschlichen Skelett- und Uterusmuskels sind noch sehr unvollständig und erstrecken sich auf wenige Enzyme, die im Gesamtextrakt bestimmt wurden(SCHMIDT und SCHMIDT 1960; SCHIMASSEK 1961). Durch Untersuchung einer größeren

Anzahl von Enzymen werden hier genauere Aussagen möglich. Die fraktionierte Extraktion liefert zusätzlich Befunde über die Stoffwechselwege in den einzelnen Zellkompartimenten und gewährt damit einen Einblick in strukturelle Probleme.

Diese beiden Gesichtspunkte waren für die folgenden Untersuchungen ausschlaggebend. Neben einer Gegenüberstellung der glatten und der quergestreiften Muskulatur werden Corpus und Cervix des Uterus einer getrennten Betrachtung unterzogen, da ihnen eine unterschiedliche Funktion zugeordnet werden muß.

In der Durchführung der Untersuchungen wurden die Aktivitäten von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels und Aminosäurestoffwechsels des mitochondrialen und cytoplasmatischen Raumes getestet und in Enzymaktivitätsmustern erfaßt, die dann einer vergleichenden Betrachtung unterzogen wurden.

M a t e r i a l u n d M e t h o d e

Untersuchungsmaterial

Nach Uterusextirpation wurde aus dem frischen Operationspräparat ein kleines Stück Gewebe aus dem Fundus uteri und der Cervix uteri entnommen und von Endometrium und Serosa freipräpariert. Es wurde darauf geachtet, daß das Gewebestück makroskopisch blutfrei war. Eventuell anhaftendes Blut wurde vorsichtig abgetupft. Blutig imbibiertes Gewebe durch eingehakte Faßzangen während der Operation wurde nicht zur Untersuchung herangezogen. Das Untersuchungsmaterial des M. pectoralis wurde bei Mammaamputationen gewonnen. Gewebeproben des M. rectus abdominis wurden bei Laparatomien entnommen.

Extraktionsverfahren

Prinzip:

Das Prinzip der fraktionierten Extraktion besteht in der Trennung der löslichen Proteine in den verschiedenen Zellräumen durch steigende osmotische und mechanische Einwirkung auf die Zelle (DELBRÜCK et al. 1959; RHODE 1963; PETTE, BROSEMER, VOGELL i. Vorb.). Postmortal besteht eine erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembran, die durch mechanische Auflockerung des Zellverbandes noch gesteigert wird. Die Extraktion verläuft schrittweise in Medien steigender Aggressivität.

Im ersten Schritt werden die im Cytoplasma frei gelösten Enzyme und andere Proteine, sowie locker gebundene Enzyme extrahiert. Die mitochondrial lokalisierten Enzyme werden erst nach Zerstörung der Mitochondrienmembran durch mechanische Einwirkung in den Extrakt überführt. Als letztes

bleiben die Enzyme, die auch durch Zerstörung aller Partikel nicht in Lösung gebracht werden können. Diese mitochondrial strukturgebundenen Enzyme bleiben im Bodenkörper zurück.

Extraktion:

Ein kleines Gewebstück wird in einem vorgekühlten Miniaturfleischwolf zerkleinert und anschließend im Verhältnis 1 : 10 in einem Saccharosemedium suspendiert.

Saccharosemedium: 0,3 M Saccharose, 10 mM TRAP,
2 mM EDTA, pH = 7,2

Durch 10 Minuten langes Plümpern (80 Bewegungen pro Minute) bei 0° C wird die Suspension intensiv bewegt. Anschließend wird die Suspension 10 Minuten bei 100 000 g in einer Ultrazentrifuge (Modell Spinco Beckman) zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und als Extrakt A bezeichnet.

Der gleiche Extraktionsschritt wird wiederholt, indem der Bodenkörper wieder im Verhältnis 1 : 10 mit Saccharosemedium suspendiert 10 Minuten lang geplümpert und anschließend bei 100 000 g zentrifugiert wird, und man gewinnt mit dem Überstand Extrakt B.

Anschließend wird das Sediment in einem Phosphatmedium (100 mM Phosphatpuffer, 2 mM EDTA, pH = 7,2) suspendiert, 15 Minuten bei 0° C durch Plümpern bewegt und bei 100 000 g zentrifugiert. Der Überstand wird als Extrakt C bezeichnet .

Das Sediment wird dann nochmals in Phosphatpuffer suspendiert und im Kältebad bei -5° C 6 mal 20 Sekunden lang mit dem Ultraturrax (TYP TP 18/12 Firma JANKE & KUNKEL KG) homogenisiert. Der nach Zentrifugation bei 100 000 g gewonnene Überstand wird Extrakt D genannt.

Im letzten Schritt wird der Rückstand nochmals mit dem Ultraturrax in Phosphatpuffer homogenisiert, aber nicht zentrifugiert. In dieser Suspension werden die Enzyme bestimmt, die fest an die mitochondrialen Strukturen gebunden sind und

nicht in Lösung gebracht werden können.

Proteingehalt

Als Bezugssystem für die Enzymuntersuchungen wurde das Frischgewicht des untersuchten Gewebes gewählt. Eine weitere Bezugsgröße für enzymologische Untersuchungen an Gewebsextrakten stellen die löslichen Proteine des Homogenatüberstandes dar, wenn der Proteingehalt des Untersuchungsmaterials konstant bleibt.

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte in allen Extrakten nach der Biuretmethode (ROBINSON 1940; WEICHSELBAUM 1946; BEISENHERZ et al. 1953). Bei einer Wellenlänge von 546 m μ und einer Schichtdicke von 2 cm wurde die Extinktion im Photometer Eppendorf gemessen. Gleichzeitig wurde ein Blindwert mitbestimmt. Der Proteingehalt in mg / ml Extrakt wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{mg Protein / ml} = \frac{(\text{Extinkt.} - \text{Extinkt. Blindwert}) \cdot 17,5}{\text{ml Extrakt}}$$

Der Faktor 17,5 wurde durch vergleichende Untersuchungen mit der Stickstoffbestimmungsmethode nach KJELDAHL für dieses Gewebe ermittelt. Da die Messungen im Absorptionsbereich für Oxyhämoglobin liegen, könnte durch größere Blutbeimengungen ein Fehler entstehen. Deshalb wurde zusätzlich die Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL durchgeführt ; die Untersuchungsergebnisse stimmen bei beiden Methoden weitgehend überein.

Enzymaktivitätsbestimmung im optischen Test

Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte bis auf besonders vermerkte Ausnahmen nach dem Prinzip des optischen

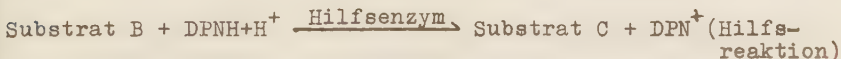
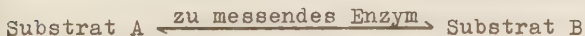
Tests von WARBURG (1935 ; 1936 ; 1938); BÜCHER, LUH, PETTE (1964) ; BEISENHERZ et al. (1953).

Photometrische Grundlage dieser optischen Tests ist das Differenzspektrum der reduzierten und oxydierten Form der Pyridinnucleotide.

Pyridinnucleotid-spezifische, wasserstoffübertragende Enzyme werden im sogenannten einfachen optischen Test, eine Gruppe anderer Enzyme im sogenannten zusammengesetzten optischen Test erfaßt. Die Reaktion des einfachen optischen Tests erfolgt nach folgendem Schema:



Der zusammengesetzte optische Test dient zur Messung solcher Reaktionen, bei denen die Pyridinnucleotide nicht direkt oxydiert oder reduziert werden. Das bei der zu messenden Reaktion gebildete Substrat wird durch eine oder mehrere Hilfsreaktionen weiter umgesetzt, bis eine Pyridinnucleotid-verbrauchende Reaktion als Indikatorreaktion benutzt werden kann. Die Enzyme der Hilfsreaktion werden im Überschuß zugesetzt, um den Reaktionsablauf nicht zu limitieren. Die Reaktion des zusammengesetzten optischen Tests erfolgt nach folgendem Schema:



Optische Tests sind nur dann vergleichbar, wenn die Bedingungen exakt eingehalten werden. Das Differenzspektrum ist in bestimmten Wellenlängenbereichen temperaturabhängig. Es ist deshalb erforderlich, die Messungen stets bei konstanter Temperatur durchzuführen.

Die unter 'Testzusammensetzungen' angeführten Konzentrationen der Substrate, Coenzyme und Enzyme geben die

mit entsprechenden Testverfahren ermittelten optimalen Konzentrationen der Substanzen in den Testlösungen an.

Unter optimalen Bedingungen ist in einem relativ weiten Bereich die Reaktionsgeschwindigkeit der eingesetzten Enzymmenge proportional. Diese Proportionalität ist ein Maß dafür, daß die Tests unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden. Es ist deshalb bei allen Untersuchungen die Exaktheit der Testbedingungen durch die Proportionalität kontrolliert worden.

Die Untersuchungen wurden mit dem Photometer Eppendorf mit kontinuierlicher Aufzeichnung nach Linearisierung durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgten die Tests bei einer Temperatur von 25°C , die Wellenlänge betrug $366\text{ m}\mu$, die gewählte Schichtdicke 1 cm und das Testvolumen 1 ml .

Berechnung der Enzymaktivitäten

Die Berechnung der Enzymaktivitäten erfolgte nach 'BÜCHER-Einheiten (BE)', wobei eine Bücher-Einheit einer Extinktionsänderung von $0,100 \cdot 100$ in 100 Sekunden entspricht. Diese Enzymeinheit entspricht einem Substratumsatz von $1,09\text{ }\mu\text{ Mol} / \text{h} / \text{ml}$. Die Berechnung der Enzymeinheiten im Testansatz erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{E/g Frisch} = \frac{\text{Extinkt. Änderung} \cdot \text{Extraktverd.} \cdot \text{Testvol(ml)} \cdot \text{'Faktor'}}{\text{Zeit (Sec.)} \cdot \text{eingesetzte Extraktmenge (ml)}}$$

Die Enzymeinheiten im optischen Test werden als Einheiten pro ml Extrakt gemessen. Da die Enzymaktivitäten im folgenden als Einheiten pro g Frischgewicht angegeben werden, wird der 'Faktor' aus

$$\frac{\text{Volumen des Überstandes (ml)}}{\text{Gewebseinwaage (g)}}$$

ermittelt.

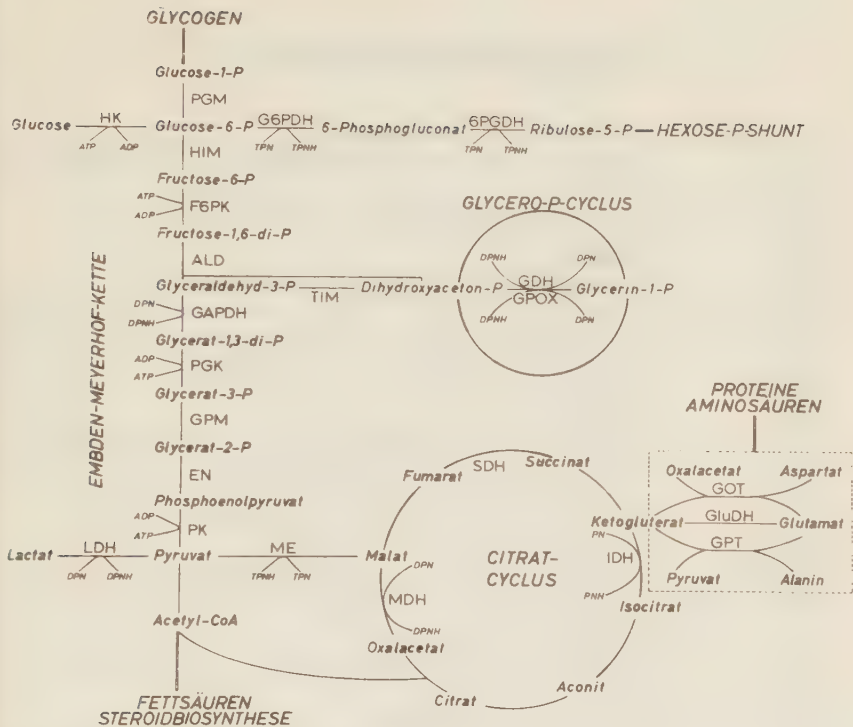
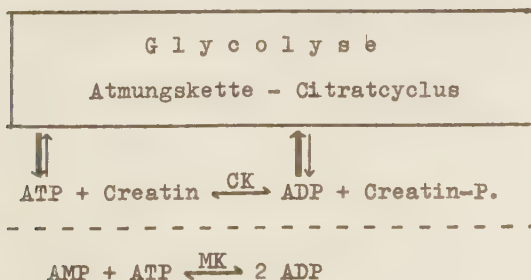


Abb. 2: Schematische Darstellung von Hauptwegen des Intermediärstoffwechsels unter Berücksichtigung der metabolischen Beziehungen der untersuchten Enzyme (Abkürzungen siehe Seite 20)



Verzeichnis der Abkürzungen

AkK	Adenylat-Kinase (Myokinase)
ALD	Aldolase
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Bücher-Einheiten
CK	Creatin-Kinase
CP	Creatin-Phosphat
DPN	Diphosphopyridinnucleotid (oxydiert)
DPNH	Diphosphopyridinnucleotid (reduziert)
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
EN	Enolase
F6PK	Fructose-6-phosphat-Kinase
GluDH	Glutamat-Dehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GDH	Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase
GPOX	Glycerin-1-phosphat-Oxydase
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPM	Glycerat-phosphat-Mutase
HK	Hexokinase
HIM	Hexose-phosphat-Mutase
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
ITP	Inosintriphosphat
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
ME	Malic Enzyme
mM	millimolar
6PGDH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
PK	Pyruvat-Kinase
PGK	3-Phosphoglycerat-Kinase
PGM	Phosphogluco-Mutase
PTG-Gruppe	Phospho-Triose-Glycerat-Gruppe
SDH	Succinat-Dehydrogenase
TRAP	Triäthylenamin-tetraacetat-Puffer
TPN	Triphosphopyridinnucleotid (oxydiert)
TPNH	Triphosphopyridinnucleotid (reduziert)
UDP	Uridindiphosphat
UDPG	Uridindiphosphat-Glucose
UTP	Uridintriphosphat

Testzusammensetzungen

Triosephosphat-Isomerase (TIM)

D-Glyceraldehyd-3-phosphat



Dihydroxyacetonphosphat

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, DPNH 0,22 mM, D-Glyceraldehyd-3-phosphat 1,5 mM, Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase 40 BE/ml Testvolumen.

Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

D-Glyceraldehyd-3-phosphat + $\text{DPN}^+ + \text{HPO}_4^{--}$



D-1,3-Diphosphoglycerinsäure + $\text{DPNH} + \text{H}^+$

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO_4 3,3 mM, Glutathion (red.) 2,4 mM, DPNH 0,22 mM, ATP 1,5 mM, D-3-Phosphoglycerat 7 mM, Phosphoglycerat-Kinase 200 BE/ml Testvolumen.

Glycerat-3-phosphat-Kinase (PGK)

D-1,3-Diphosphoglycerinsäure + ADP



D-3-Phosphoglycerinsäure + ATP

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO_4 6,6 mM, DPNH 0,22 mM, Glutathion (red.) 2,4 mM, ATP 1,5 mM, D-3-Phosphoglycerat 14 mM, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase 100 BE/ml Testvolumen.

Glycerat-phosphat-Mutase (GPM)

D-3-Phosphoglycerat



D-2-Phosphoglycerat

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, KCl 75 mM, MgSO_4 8 mM, DPNH 0,22 mM, ADP 1 mM, 2,3-Diphosphoglycerat 0,5 mM, D-3-Phosphoglycerat 7 mM, Enolase 40 BE/ml Testvolumen, Pyruvatkinase 80 BE/ml Testvol. , Lactat-Dehydrogenase 120 BE/ml Testvol.

Enolase (EN)

D-Glycerat-2-phosphat



Phosphoenolpyruvat + H₂O

Imidazol 100 mM, MgSO₄ 8 mM, D-Glycerat-2-phosphat 8,8 mM

Die Bildung von Phosphoenolpyruvat wird bei einer Wellenlänge von 240 nm direkt gemessen.

Hexosephosphat-Isomerase (HIM)

Fructose-6-phosphat



Glucose-6-phosphat

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, TPN 0,3 mM, Fructose-6-phosphat

1,6 mM, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase 60 BE/ml Testvol.

Fructose-6-phosphat-Kinase (F6PK)

Fructose-6-phosphat + ATP



Fructose-1,6-diphosphat + ADP

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO₄ 8 mM, DPNH 0,22 mM, ATP 1,5 mM,

Fructose-6-phosphat 1,6 mM, Aldolase 40 BE/ml Testvol. ,

Triosephosphat-Isomerase 80 BE/ml Testvol., Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase 120 BE/ml Testvol.

Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase (ALD)

Fructose-1,6-diphosphat



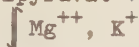
Dihydroxyacetonphosphat + Glyceraldehyd-3-phosphat

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, DPNH 0,22 mM, Fructose-1,6-diphosphat 4 mM, Triosephosphat-Isomerase 40 BE/ml Testvol.,

Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase 60 BE/ml Testvol.

Pyruvat-Kinase (PK)

Phosphoenolpyruvat + ADP



Pyruvat + ATP

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO_4 8 mM, KCl 75 mM, DPNH 0,22 mM, ADP 1,5 mM, Phosphoenolpyruvat 0,8 mM, Lactat-Dehydrogenase 40 BE/ml Testvol.

L-Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Pyruvat + DPNH + H^{+}



L-Lactat + DPN^{+}

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, DPNH 0,22 mM, Pyruvat 2,4 mM

Glucose-phosphat-Mutase (PGM)

Glucose-1-phosphat



Glucose-6-phosphat

TRAP 50 mM, EDTA 5mM, MgSO_4 8 mM, TPN 0,3 mM, Cystein 10 mM, Glucose-1-phosphat 8 mM, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase 40 BE/ml Testvol.

Hexokinase (HK)

Hexose + ATP $\xrightleftharpoons{\text{Mg}^{++}}$ Hexose-6-phosphat

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO_4 8 mM, TPN 0,3 mM, ATP 1,5 mM, D-Glucose 2 mM, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase 40 BE/ ml Testvol.

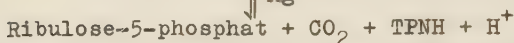
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)

Glucose-6-phosphat + TPN^{+}

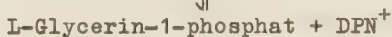


6-Phosphogluconsäure + TPNH + H^{+}

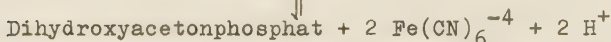
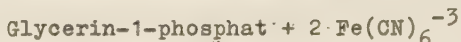
TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, TPN 0,3 mM, Glucose-6-phosphat 2 mM,

6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PGDH)

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO_4 8 mM, TPN 0,3 mM, 6-Phosphogluconsäure 1 mM

Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase (GDH)

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, DPNH 0,22 mM, Dihydroxyacetonphosphat 0,4 mM.

Glycerin-1-phosphat-Oxydase (GPOX)

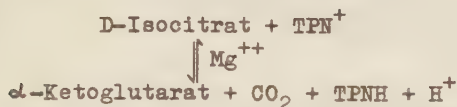
K-Na-Phosphatpuffer 100 mM, pH 7,6, EDTA 5 mM, Albumin 0,4 mg/ml, KCN 1 mM, $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ 1 mM, L-Glycerin-1-phosphat 20 mM.

An Stelle des physiologischen Elektronenakzeptors wird K-Ferri-cyanid zugesetzt, bei dem ebenso wie bei Pyridinnucleotiden eine Änderung des Redoxstatus von einer photometrisch meßbaren Änderung der Extinktion begleitet ist. Der Elektronenabtransport über die Atmungskette wird durch Zugabe von KCN blockiert. Der Extinktionskoeffizient für $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ bei einer Wellenlänge von 405 mμ beträgt $0,93 \times 10^6$ (cm^2/Mol). Die Angabe der Aktivität der GPOX erfolgt in mM l Substratumsatz / Stunde / g Frischgewicht.

Malat-Dehydrogenase (MDH)

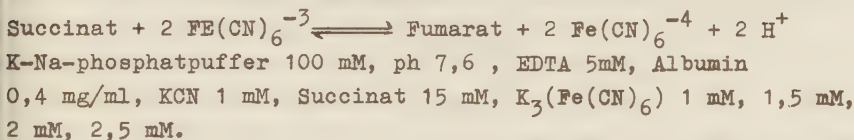
TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, DPNH 0,22 mM, Oxalacetat 0,2 mM

Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)



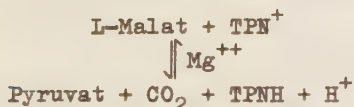
TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO_4 8 mM, TPN 0,3 mM, D-Isocitrat 1,3 mM.

Succinat-Dehydrogenase (SDH)



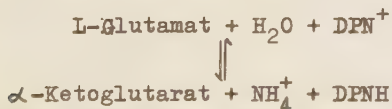
Es handelt sich bei diesem Test im Prinzip um den gleichen Vorgang, wie er für die GPOX beschrieben wurde. Da es nicht möglich ist, im Testgemisch die sehr hohe Konzentration von $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ einzusetzen, die dem Substratoptimum entspricht, wurden zur Messung der SDH-Aktivität jeweils 4 Tests mit steigender Ferricyanid-Konzentration ausgeführt. Aus dieser Reihe wird mit Hilfe der LINEWEAVER und BURK Gleichung die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung errechnet.

Malic-Enzyme (ME)



TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO_4 8 mM, TPN 0,3 mM, L-Malat 2 mM

Glutamat-Dehydrogenase (GluDH)



TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 mM, DPNH 0,22 mM, α -Ketoglutarat 3 mM.

Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)

L-Aspartat + α -Ketoglutarat



Oxalacetat + L-Glutamat

$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM, EDTA 5 mM, DPNH 0,22 mM, α -Ketoglutarat 5 mM, L-Aspartat 20 mM, Malat-Dehydrogenase 40 BE/ml Testvol.

Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)

L-Alanin + α -Ketoglutarat



Pyruvat + L-Glutamat

$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM, EDTA 5 mM, DPNH 0,22 mM, α -Ketoglutarat 7 mM, L-Alanin 40 mM, Lactat-Dehydrogenase 40 BE/ml Testvol.

Creatin-Kinase (CK)

Creatin + ATP $\xrightleftharpoons{\text{Mg}^{++}}$ Creatinphosphat + ADP

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO_4 8 mM, DPNH 0,22mM, ATP 3 mM, Creatin 25 mM, Phosphoenolpyruvat 0,8 mM, Pyruvat-Kinase 60 BE/ml Testvol., Lactat-Dehydrogenase 120 BE/ml Testvol.

Adenylat-Kinase (AdK) bzw. Myokinase (MK)

ATP + AMP = 2 ADP

TRAP 50 mM, EDTA 5 mM, KCl 75 mM, MgSO_4 8 mM, DPNH 0,22 mM ATP 3 mM, AMP 3 mM, Phosphoenolpyruvat 0,8 mM, Pyruvat-Kinase 65 BE/ml Testvol., Lactat-Dehydrogenase 140 BE/ml Testvol.

Ergebnisse der Proteinbestimmung

Über die Proteinbestimmung im Myogen gibt es zwei Methoden, die auf Grund des Extraktionsverfahrens zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Bei dem von PETTE (1960), CZOCK und BÜCHER (1961) und in dieser Arbeit angewandten Verfahren finden nahezu isotonische Extraktionsmedien Verwendung, durch die die leicht löslichen Proteine extrahiert werden. In diesem Extrakt werden jeweils die enzymatisch wirksamen Proteine des Cytoplasmas und der Mitochondrien bestimmt. Myosin und Aktin bilden mit dem Stroma den Bodenkörper und werden nicht gesondert nachgewiesen. Der Anteil an löslichen Proteinen beträgt 34 - 38 %.

HASSELBACH und SCHNEIDER (1951)	PETTE (1960)
Globular Proteine 28%	Cytoplasmatische Proteinfraktion 28-32% 0,3M Saccharose Medium
Myosin 38%	Mitochondriale Proteinfraktion 6%
Actin 13-15%	Strukturgebundene mitochondriale Proteinfraktion (Rückstand) (Myosin, Actin, Stroma, ect.)
Stroma 15-17%	

Abb. 3: Prozentuale Verteilung der verschiedenen Proteinfraktionen des Kaninchen-Skelettmuskels (aus CZOCK u. BÜCHER 1961

Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von HASSELBACH und SCHNEIDER (1951), die durch Anwendung hoher Salzkonzentrationen neben den leicht löslichen Proteinen auch

Aktin und Myosin in Lösung brachten. Durch einen weiteren Arbeitsgang wurde Myosin präzipitiert und bestimmt und schließlich der genaue Anteil des Stroma^a ermittelt.

Der in den Untersuchungen von Hasselbach und Schneider mit 28 % angegebene Anteil an leicht löslichen Proteinen liegt niedriger als der von Pette angegebene Anteil mit 34 - 38 %. Die Differenz erklärt sich vermutlich durch die unvollständige Extraktion der Mitochondrien, die bei dem von Hasselbach und Schneider angewandten Verfahren dem Stroma zugerechnet werden.

Auf Grund der unterschiedlichen Extraktionsverfahren ist es nicht möglich, die Ergebnisse beider Proteinbestimmungsmethoden miteinander zu vergleichen.

GEWEBE	PROTEINGEHALT in mg/g Frischgewicht				arith. Mittel
	1	2	3	4	
CERVIX UTERI	35.71	34.09			34.90
CORPUS UTERI	56.31	58.07	57.40	52.79	56.14
M. PECTO- RALIS	86.70	88.36	89.09		88.05
M. RECTUS ABDOMINIS	96.56	92.40	95.30	98.80	95.78

Abb. 4 : Proteingehalt der glatten und quergestreiften Muskulatur in mg/g Frischgewicht.

Abb.4 zeigt den Proteingehalt der untersuchten Gewebe in mg/g Frischgewicht. In diesem Zusammenhang fällt auf, daß eine Proportionalität zwischen Proteingehalt und Enzymaktivität (Tab. 3 u. 4) besteht. Die Cervix weist die geringsten enzymatischen Aktivitäten auf und dementsprechend auch den geringsten Proteingehalt, während im M. rectus abd. die höchsten Aktivitäten und der größte Proteingehalt nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 3: Enzymaktivitäten der Cervix uteri und des Corpus uteri des Menschen in 'Bücher-Einheiten' pro g Frischgewicht.

Enzym	Cervix uteri					Arithm. Mittel	Corpus uteri							Arithm. Mittel
	1	2	3	4	Versuche		1	2	3	4	5	6	7	
TIM	10.925	11.422	10.630	10.875	10.988	30.845	31.850	31.246	28.750	29.020	20.980	20.240	30.418	
GAPDH	1.072	1.120	1.030	1.095	1.089	3.010	3.145	3.095	2.910	2.994	3.135	2.876	3.000	
PGK	998	1.048	949	987	995	2.870	2.990	2.970	2.740	2.880	2.910	2.805	2.869	
GPM	889	924	849	876	885	2.502	2.620	2.605	2.395	2.400	2.550	2.475	2.507	
EN	204	213	195	203	204	591	620	605	567	570	598	581	590	
HIM	521	544	496	518	519	1.590	1.635	1.600	1.523	1.520	1.590	1.581	1.578	
F6PK	191	200	182	189	190	574	599	590	555	560	579	563	577	
ALD	74	80	69	75	75	227	238	232	219	220	225	230	227	
PK	503	526	479	500	502	1.494	1.570	1.532	1.492	1.493	1.505	1.472	1.491	
LDH	521	543	497	518	519	2.196	2.293	2.245	2.099	2.110	2.200	2.145	2.184	
PGM	128	134	123	128	128	221	230	229	210	216	223	219	221	
HK	14	16	12	14	14	26	29	32	23	20	27	24	26	
G6PDH	14	17	13	12	14	69	73	70	74	65	68	66	69	
6PGDH	3	5	2	3	3	10	13	13	7	9	11	10	10	
GDH	14	17	11	15	14	8	13	12	6	7	8	6	8	
GPOX	14	17	11	15	14	17	17	13	---	---	23	14	17	
MDH	774	809	742	770	774	2.441	2.555	2.560	2.334	2.342	2.465	2.436	2.448	
IDH	19	22	17	18	19	60	66	64	56	54	60	58	60	
SDH	16	20	13	17	16	18	---	14	---	17	17	21	15	
ME	4	6	3	5	4	4	5	7	4	4	2	4	4	
GludH	33	37	30	32	33	106	111	110	110	101	106	105	104	
GOT	78	82	75	77	78	171	180	---	169	169	170	168	171	
GPT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CK	657	688	626	658	657	597	629	620	600	569	571	590	598	
AdK	354	373	339	362	354	521	540	535	509	500	525	515	521	

Tabelle 4: Enzymaktivitäten des M. pectoralis und des M. rectus abdominis des Menschen in 'Bücher-Einheiten' pro g Frischgewicht.

M. pectoralis											M. rectus abdominis										
Enzym	Versuche					Arithm. Mittel	Versuche					Arithm. Mittel	Versuche								
	2	3	4	5	1		2	3	4	1	2		3	4							
TIM	228.450	224.900	230.710	226.100	228.680	227.300	268.550	2720000	273.600	269.000	270.700	269.000									
GAPDH	22.450	22.130	22.600	22.356	22.517	27.500	26.833	26.125	27.030	26.190	26.736	26.736									
PGK	20.840	20.345	20.955	20.430	20.756	25.300	26.320	24.900	25.020	26.100	25.530	25.530									
GPM	22.810	23.290	22.950	22.400	22.770	23.377	22.730	23.900	23.400	22.980	23.277	23.277									
EN	4.280	4.392	4.320	4.190	4.276	5.090	4.910	5.200	5.162	5.890	5.250	5.250									
HIM	3.132	3.300	3.200	3.090	3.143	3.301	3.379	3.222	3.320	3.281	3.299	3.299									
F6PK	3.929	3.090	3.990	3.870	3.726	4.220	4.385	---	4.095	4.262	4.240	4.240									
ALD	3.742	3.890	3.798	3.610	3.727	4.952	5.098	4.850	4.900	4.992	4.960	4.960									
PK	6.760	6.980	6.830	6.600	6.725	7.553	7.885	7.320	7.610	7.500	7.574	7.574									
LDH	18.480	18.090	18.320	18.600	18.496	10.030	---	11.030	10.990	10.778	10.778	10.778									
PGM	586	610	---	580	574	587	618	552	570	581	582	582									
HK	79	74	75	79	77	91	96	86	86	93	90	90									
G6PDH	4	6	3	5	5	7	---	5	10	6	7	7									
6PGDH	8	9	6	8	7	6	9	5	10	5	7	7									
GDH	1.022	1.073	1.030	1.010	1.021	1.479	1.519	1.426	1.480	1.436	1.437	1.437									
GPOX	58	61	---	---	58	62	---	53	59	71	61	61									
MDH	7.296	7.070	7.372	7.120	7.291	9.550	9.722	9.293	9.543	9.590	9.534	9.534									
IDH	221	232	222	218	221	167	175	161	164	169	167	167									
SDH	117	123	---	119	117	97	---	109	92	96	99	99									
ME	8	10	7	6	8	9	12	7	9	---	9	9									
FludH	11	14	9	11	12	17	15	19	16	20	17	17									
GOT	2.423	2.540	2.480	2.320	2.413	1.830	1.872	1.809	1.840	1.829	1.836	1.836									
GPT	648	679	655	641	648	680	709	652	---	678	680	680									
CK	11.320	11.790	11.095	11.200	11.557	16.920	16.692	16.590	16.700	17.200	16.820	16.820									
AdK	13.620	13.950	13.780	13.550	13.620	14.500	14.100	14.830	14.300	14.192	14.384	14.384									

Enzymaktivitäten

Der Unterschied in der Enzymausstattung der glatten und der quergestreiften Muskulatur wird bei Betrachtung der absoluten Enzymaktivitäten im Uterus- und Skelettmuskel des Menschen deutlich (Tab. 3 und 4).

Im System der Glycolyse liegen die Enzymaktivitäten im M. rectus abdominis meist um den Faktor 7-9 höher als im Corpus uteri. Dagegen kann man den Unterschied in den Enzymaktivitäten zwischen M. rectus abdominis und M. pectoralis, der im Faktor 1,2 zum Ausdruck kommt, hinsichtlich der vergleichenden Betrachtung zwischen glatter und quergestreifter Muskulatur unberücksichtigt lassen. Das Verhalten der Lactat-Dehydrogenase in beiden quergestreiften Muskeln zeigt eine Besonderheit, die Aktivität liegt im M. pectoralis um den Faktor 1,7 höher als im M. rectus abdominis. Durch diese Umkehr wird möglicherweise die Potenz zur Milchsäurebildung des schneller reagierenden Muskels erklärt.

Im Pentosephosphat-Cyclus, einem Seitenweg der Glycolyse, fällt die deutlich höhere Aktivität der G6PDH und der 6PGDH im Corpus uteri gegenüber der quergestreiften Muskulatur auf. Die Aktivität der G6PDH liegt beispielsweise im Corpus uteri um den Faktor 14 höher als im M. pectoralis.

Der Glycero-Phosphat-Cyclus der quergestreiften Muskulatur weist eine 180-fach höhere Ausstattung mit GDH auf als die glatte Muskulatur. Nach Untersuchungen von SCHIMASSEK (1961) sind in der glatten Muskulatur nur auffallend niedrige Aktivitäten von GDH nachweisbar. Die Aktivität der GPOX liegt in der quergestreiften Muskulatur 3 - 4-fach höher als in der glatten Muskulatur.

Die Enzyme des Citrat-Cyclus sind ebenfalls im Skelettmuskel mit 3-6fach höheren Aktivitäten vertreten als in der glatten Muskulatur und liegen im M.pectoralis höher als im M.rectus abdominis.

Auch die GluDH zeigt ein abweichendes Verhalten, ihre Aktivität ist im glatten Muskel um den Faktor 6 höher als im quergestreiften Muskel.

Die GOT weist dagegen eine 10-14fach höhere Aktivität in der Skelettmuskulatur auf und liegt im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen im M.pectoralis höher als im M.rectus abdominis. Im Uterusmuskel ließ sich keine Aktivität der GPT nachweisen, ein Befund, der besonders auffällig ist, wenn man die im quergestreiften Muskel relativ hohe Aktivität dieses Enzyms zum Vergleich heranzieht.

Die Phosphotransferasen sind im quergestreiften Muskel mit 20-30fach höheren Aktivitäten nachweisbar als im glatten Muskel.

Gegenüber dem Corpus uteri beträgt die Enzymausstattung der Cervix uteri nur ein Drittel der Aktivitäten des Corpus. Dieses würde mit der unterschiedlichen Verteilung von Muskulatur und Bindegewebe in den beiden Abschnitten des Uterus übereinstimmen. Nach CRETIUS (1958) und DUBRAUSZKY (1962) enthält das Corpus uteri 45% und die Cervix uteri 15% Muskelfasern. Die Aktivitäten der Phosphotransferasen in beiden Abschnitten des Uterus liegen aber gleich hoch, so daß man annehmen kann, daß die Differenzen in der Enzymverteilung nicht ausschließlich durch das Verhältnis Muskulatur-Bindegewebe, sondern durch funktionelle Differenzen bedingt ist.

E r g e b n i s s e

Die fraktionierte Extraktion ermöglicht ein schrittweises Herauslösen der löslichen Proteine aus dem Zellraum. Zunächst werden die Enzyme des extramitochondrialen Raumes extrahiert, und später wird der mitochondriale Zellraum eröffnet. Eine eindeutige Zuordnung zum mitochondrialen Anteil wird durch Vergleich mit Enzymbestimmungen an isolierten Mitochondrien möglich. Durch den Extraktionsvorgang gewinnt man die löslichen Proteine der Zelle in vier Fraktionen.

1. Im Extrakt A und B erscheinen die leicht extrahierbaren Proteine, die durch Plümpern in einem isotonischen Saccharosemedium aus der mechanisch weitgehend intakten Zelle herausgelöst werden.
2. Nach Anwendung des hypotonen Phosphatpuffers werden die schwer extrahierbaren Proteine in den Extrakt C überführt; das Plümpern erleichtert auch hier das Herausdiffundieren der Proteine.
3. Durch mechanische Desintegration des Gewebes werden jene Enzyme freigesetzt und in Lösung gebracht, die bisher der Einwirkung des Extraktionsmediums entzogen waren. Es handelt sich um die Enzyme des mitochondrialen Raumes.
4. Die Sedimentfraktion enthält die strukturgebundenen Enzyme.

Extraktionsverhalten und cytologische Zuordnung

Die fraktionierte Extraktion führte zu einer Trennung der Enzyme des extra- und intramitochondrialen Raumes. In den Tabellen 6 - 8 ist die Enzymaktivitätsverteilung in den einzelnen Extrakten wiedergegeben in Form der Gesamtaktivität/ g Frischgewebe und der prozentualen Verteilung in den einzelnen Extrakten.

Tabelle 5: Enzymaktivitäten in 'Bücher-Einheiten' und ihre prozentuale Verteilung in den einzelnen Fraktionen der Cervix uteri des Menschen.

Enzym	n	Extremwerte	arithm. Mittel	Extr. A	prozentuale Verteilung				Sediment
					Extr. B	Extr. C	Extr. D		
PGM	4	123 -	134	97	3	0	0		
HK	4	12 -	16	51	14	7	28		
G6PDH	4	12 -	17	91	7	2	0		
6PGDH	4	2 -	5	94	5	1	0		
HIM	4	496 -	544	95	4	1	0		
P6PK	4	182 -	200	95	3	2	0		
AID	4	69 -	80	30	14	55	1		
TIM	4	10.630 -	11.422	96	3	1	0		
GDM	4	2 -	5	100	0	0	0		
GAPDH	4	1.030 -	1.120	7	1	88	4		
PGK	4	949 -	1.048	85	9	6	0		
GPM	4	849 -	924	94	5	1	0		
EN	4	195 -	213	96	4	0	0		
PK	4	479 -	526	95	4	1	0		
IDH	4	497 -	543	96	4	0	0		
ME	4	3 -	6	100	0	0	0		
AdK	4	339 -	373	96	3	1	0		
CK	4	626 -	688	97	3	0	0		
GPT	4	0 -	0	0	0	0	0		
GludH	4	30 -	37	7	12	18	63		
GPOX	4	11 -	17	0	0	0	0	100	
SDH	4	13 -	20	0	0	0	0	100	
GOT	4	75 -	82	71	5	4	20		
MDH	4	742 -	809	64	3	8	25		
IDH	4	17 -	22	71	5	4	20		

Tabelle 6: Enzymaktivitäten in 'Bücher-Einheiten' pro g Frischgewicht und ihre prozentuale Verteilung in den einzelnen Fraktionen des Corpus uteri des Menschen.

Enzym	n	Extremwerte	arithm. Mittel	prozentuale Verteilung				
				Extr. A	Extr. B	Extr. C	Extr. D	Sediment
PGM	7	210 -	221	96	3	1	0	
HK	7	20 -	26	53	12	6	29	
G6PDH	7	65 -	69	90	8	2	0	
6PGDH	7	7 -	10	82	13	5	0	
HIM	7	13 -	1.578	95	4	1	0	
F6PK	7	1.520 -	577	95	3	2	0	
ALD	7	555 -	227	7	1	88	4	
TIM	7	219 -	30.418	96	3	1	0	
GDH	7	28.750 -	8	100	0	0	0	
GAPDH	7	6 -	3.000	8	2	85	5	
PGK	7	2.910 -	2.869	84	10	5	1	
GPM	7	2.740 -	2.507	94	5	1	0	
EN	7	2.395 -	590	96	4	0	0	
PK	7	570 -	1.401	95	4	1	0	
IDH	7	1.429 -	2.184	94	4	1	1	
ME	7	2.099 -	4	86	2	2	10	
AdK	7	2 -	521	96	3	1	0	
CK	7	500 -	598	97	3	0	0	
GPT	7	569 -	0	0	0	0	0	
		0 -						
GludH	7	101 -	106	11	12	20	57	100
GPOX	5	13 -	17	0	0	0	0	100
SDH	5	14 -	15	0	0	0	0	100
GOT	6	169 -	171	67	7	4	22	
MDH	7	2.334 -	2.448	68	4	9	19	
IDH	7	54 -	60	76	4	4	17	

Tabelle 7: Enzymaktivitäten in 'Bücher-Einheiten' pro g Frischgewicht und ihre prozentuale Verteilung in den einzelnen Fraktionen des M. pectoralis des Menschen.

Enzym	n	Extremwerte	arithm. Mittel	prozentuale Verteilung				
				Extr. A	Extr. B	Extr. C	Extr. D	Sediment
PGM	4	559 -	574	94	4	1,7	0,3	
HK	4	74 -	77	67	6	11	16	
G6PDH	5	3 -	5	94	5	1	0	
6PGDH	5	5 -	7	92	8	0	0	
HIM	5	3.020 -	3.300	95	4	1	0	
F6PK	5	3.090 -	3.726	93	4	2	1	
ALD	5	3.594 -	3.890	68	2	28	2	
TIM	5	224.990 -	228.680	96	4	0	0	
GDH	5	972 -	1.073	97	2	1	0	
GAPDH	5	22.130 -	22.517	67	2	28	3	
PGK	5	20.354 -	20.756	94	4	1	0	
GPM	5	22.400 -	22.770	95	4	1	0	
EN	5	4.190 -	4.392	94	5	1	0	
PK	5	6.470 -	6.725	92	7	1	0	
LDH	5	18.090 -	18.496	94	4	2	0	
ME	4	6 -	8	92	5	2	1	
AdK	5	13.200 -	13.620	97	3	0	0	
CK	5	11.095 -	11.357	94	4,2	0,2	1,6	
GPT	5	618 -	648	91	5	3	1	
GLUDH	5	9 -	12	0	0	0	100	100
GPOX	3	55 -	58	0	0	0	0	100
SDH	4	109 -	117	0	0	0	0	
GOT	5	2.301 -	2.413	60	4	2	34	
MDH	5	7.070 -	7.291	64	5	3	28	
IDH	5	212 -	221	10	1,5	0,5	88	

Tabelle 8: Enzymaktivitäten in 'Bücher-Einheiten' pro g Frischgewicht und ihre prozentuale Verteilung in den einzelnen Fraktionen des M. rectus abdominis des Menschen.

Enzym	n	Extremwerte	arithm. Mittel	prozentuale Verteilung				
				Extr. A	Extr. B	Extr. C	Extr. D	Sediment
PGM	5	552 -	618	94	4	1,7	0,3	
HK	5	86 -	96	67	6	11	16	
G6PDH	4	5 -	10	94	5	1	0	
6PGDH	4	5 -	10	92	8	0	0	
HIM	5	3.212 -	3.379	95	4	1	0	
F6PK	4	4.095 -	4.385	93	4	2	0	
ALD	5	4.850 -	5.098	52	4	42	1	
TIM	5	268.550 -	273.600	96	4	0	2	
GDH	5	1.426 -	1.519	97	4	1	0	
GAPDH	5	26.125 -	27.500	53	3	42	0	
PGK	5	24.900 -	26.320	94	4	2	2	
GPM	5	22.730 -	23.900	95	4	1	0	
EN	5	4.910 -	5.880	94	5	1	0	
PK	5	7.320 -	7.785	92	7	1	0	
LDH	4	10.330 -	11.030	94	4	2	0	
ME	4	7 -	12	92	5	2	1	
AdK	5	14.100 -	14.830	97	2,6	0,4	0	
CK	5	16.590 -	17.200	95	1	0,6	3,4	
GPT	4	652 -	709	91	5	2	1	
GLDH	5	15 -	20	0	0	0	100	100
GPOX	4	53 -	71	0	0	0	0	100
SDH	4	92 -	109	0	0	0	0	
GOT	5	1.809 -	1.872	52	4	2	42	
MDH	5	9.293 -	9.722	49	6	3	42	
IDH	5	161 -	175	10	1,5	0,5	88	

Bei den verschiedenen Extraktionsschritten werden jeweils gleichartige Enzymproteine herausgelöst. Nach DELBRÜCK et al. (1959) haben alle zu einem Aktivitätsverteilungstyp gehörenden Enzyme wegen der gleichartigen Extrahierbarkeit mit großer Wahrscheinlichkeit die gleiche Lokalisation in der Muskelzelle.

In den Tabellen 5 - 8 fallen drei Verteilungstypen auf. In die erste Gruppe gehören die Enzyme, die in den vier Extraktionsschritten einen kontinuierlichen Abfall der Aktivität zeigen. Es sind dies die Typ I Enzyme. Dieses Extraktionsverhalten kann man nach DELBRÜCK mit Verhältnissen vergleichen, ' wie sie sich beim Auswaschen einer mit Lösung durchtränkten Matrix ergeben würden, deren Umhüllung aufgerissen worden ist'.

In diese Gruppe gehören:

Typ I Enzyme: Extramitochondrial-cytoplasmatische Enzyme

AdK	Adenylat-Kinase, Myokinase
ALD	Aldolase
EN	Enolase
F6PK	Fructose-6-phosphat-Kinase
GDH	Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPM	Glycerophosphat-Mutase
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
6PGDH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
HK	Hexokinase
HIM	Hexose-phosphat-Isomerase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
ME	Malic Enzyme
PGK	3-Phosphoglycerat-Kinase
PGM	Phosphogluco-Mutase
PK	Pyruvat-Kinase
TIM	Triose-phosphat-Isomerase
CK	Creatin-Kinase

DELBRÜCK et al.(1959) fanden eine Zugehörigkeit dieser Enzyme zur Enzymgarnitur des extramitochondrialen Raumes. In diesen Untersuchungen wurden Enzyme in isolierten Mitochondrien bestimmt. Dabei wurde festgestellt, daß die Mitochondrien keine GDH-Aktivität enthalten. Aus diesem Grund werden alle Enzyme, die ein gleiches oder ähnliches Extraktionsverhalten zeigen wie die GDH, dem extramitochondrialen Raum zugeordnet.

Einige Enzyme, die im Cytoplasma lokalisiert sind, zeigen eine Besonderheit im Extrakt C, wo es nach kontinuierlichem Abfall bei Anwendung eines stärkeren Extraktionsmediums zu einem Anstieg der Aktivität kommt. Zu dieser Enzymgruppe gehören beispielsweise die ALD, GAPDH und HK. Für dieses Verhalten kommt als Erklärung eine unterschiedlich feste Bindung an die Strukturen der Zelle in Frage. Im Falle der Hexokinase ist eine stärkere Fixierung an die Zellmembran und an die Oberfläche der Mitochondrien zu diskutieren (CRANE and SOLS 1953), wobei erst durch Anwendung eines stärker wirksamen Extraktionsmediums die Ablösung erreicht wird. Für GAPDH und ALD liegen Untersuchungen vor, die eine Adsorption der Enzymproteine an die Myofibrillen und damit eine schwerere Extrahierbarkeit wahrscheinlich machen (BAUER et al. 1964; AMERSON et a. 1964).

Einem zweiten Verteilungstyp gehören die Enzyme an, deren Aktivität im Extrakt D ein deutliches Maximum besitzt (Typ II Enzyme). Untersuchungen an präparierten Mitochondrien ergaben, daß diese Enzyme mitochondrial lokalisiert sind.

Typ II Enzyme: Mitochondriale Enzyme

GLUDH	Glutamat-Dehydrogenase
GPOX	Glycerin-1-phosphat-Oxydase
SDH	Succinat-Dehydrogenase

Die GPOX und die SDH sind an die Fragmente der Mitochondrien fixiert und somit strukturgebunden, sie sind zu 100 % im Sediment nachweisbar.

In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß das Extraktionsverhalten der GluDH des glatten Muskels hier eine Ausnahme bildet. Die GluDH ist in diesem Gewebe im cytoplasmatischen Raum in den einzelnen Extraktionsschritten mit steigender Aktivität nachweisbar. Etwa 60 % GluDH finden sich in der mitochondrialen Fraktion, im allgemeinen gilt die GluDH als ein mitochondriales Enzym. Es ist nicht wahrscheinlich, daß ein Fehler in der Extraktion vorliegt. Möglicherweise ist das Erscheinen der GluDH in der extramitochondrialen Fraktion durch leichte Diffusion aus den Mitochondrien bedingt. Es kann aber nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß in diesem Gewebe eine cytoplasmatische GluDH vorhanden ist.

Als letzte Gruppe sind die zweiörtig lokalisierten Enzyme zu behandeln, die sowohl in den Mitochondrien, als auch im Cytoplasma wirksam sind (Typ III Enzyme).

Typ III Enzyme : zweiörtig, intra- und extramitochondrial lokalisierte Enzyme

GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
MDH	Malat-Dehydrogenase
TPN-IDH	TPN-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase

Zur Unterscheidung werden diese Typ III Enzyme als c-GOT und m-GOT u. s. w. bezeichnet. Im Extrakt A liegt das Maximum des cytoplasmatischen Anteils, es erfolgt in den Extrakten B und C ein kontinuierlicher Abfall und nach Desintegration der Zelle im Extrakt D ein erneuter Anstieg. Die Enzyme in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle katalysieren die gleiche Reaktion, haben aber, wie BÜCHER (1958) und DELBRÜCK et al. (1959) zeigen konnten, eine unterschiedliche Kinetik. So liegt die Substratsättigung für Oxalacetat bei der cytoplasmatischen MDH (c-MDH) mit 200 μ Mol um den Faktor 10 höher als für die mitochondriale (m-MDH).

Durch diesen Befund wird der Wert der fraktionierten Extraktion deutlich herausgestellt, da eine getrennte Bestimmung der m-MDH und c-MDH möglich wird, die beide folgende Reaktion katalysieren:



DAVIES and KUN (1957) wiesen eine wirksame Substrathemmung für die m-MDH aus Herzmuskelmitochondrien nach. In dem hier angewandten Testansatz wird zur Bestimmung beider Malat-Dehydrogenasen die gleiche Oxalacetatkonzentration eingesetzt. Man wird aber damit den beiden Enzymen mit ihrer unterschiedlichen Substratsättigung nicht gerecht. Es hat sich jedoch gezeigt, daß bei Verwendung einer mittleren Substratkonzentration die Tests für beide Malat-Dehydrogenasen proportional laufen.

D i s k u s s i o n

Vergleichende Betrachtungen zum Kohlenhydratstoffwechsel der Muskulatur

Embden-Meyerhof-Weg

Die Energieversorgung des Muskels erfolgt im wesentlichen durch den Abbau von Glucose und Glycogen. Für die Metabolisierung dieser Energieträger stehen die Enzyme des Embden-Meyerhof-Weges zur Verfügung. Unter aeroben Bedingungen läuft dieser Weg bis zum Pyruvat, das über den Citrat-Cyclus abgebaut und schließlich über die Atmungskette endoxydiert wird. Dieser Weg scheint der normale Stoffwechselweg zu sein. Für besonders ungünstige Arbeitsbedingungen, unter denen der Muskel eine 'Sauerstoffschuld' eingeht, steht die anaerobe Glycolyse als Stoffwechselweg zur Verfügung. Sie benutzt die Enzymgarnitur des Embden-Meyerhof-Weges und weist nur an einer Stelle eine Abweichung auf. Die Brenztraubensäure wird nicht in den Krebscyclus eingeschleust, sondern zu Lactat hydriert. Das reduzierte Coenzym wird durch diesen Schritt reoxydiert und steht erneut für die Glycolyse zur Verfügung. In Gegenwart von Sauerstoff erfolgt allerdings die Oxydation in der Atmungskette. Das weitere Schicksal des Lactatmoleküls wird durch die Leber bestimmt, wo es zu Glycogen resynthetisiert wird.

In den dargestellten Funktionen des Embden-Meyerhof-Weges müssen wir eine gute Enzymausstattung für solche Gewebe fordern, bei denen unter physiologischen Bedingungen ein Sauerstoffmangel eintreten kann, wie es zum Beispiel in der Muskulatur der Fall sein kann.

Die Gegenüberstellung der Enzyme des Embden-Meyerhof-Weges in der quergestreiften Muskulatur und der glatten Muskulatur zeigt, daß die höchsten Enzymaktivitäten im Skelettmuskel nachgewiesen werden können. Die Aktivitäten in der glatten Muskulatur liegen um den Faktor 10 niedriger als in der quergestreiften Muskulatur. Diese Unterschiede stellen das biochemische Äquivalent zur mechanischen Funktion dar. Die rasche Aktion der Skelettmuskulatur erfordert mehr Energie und eine schnellere Bereitstellung der Energie. Der auf Grund seiner anatomischen Struktur nur zu träger Funktion fähige glatte Muskel hat bei seinen vorwiegenden Haltefunktionen einen weit niedrigeren Energiebedarf.

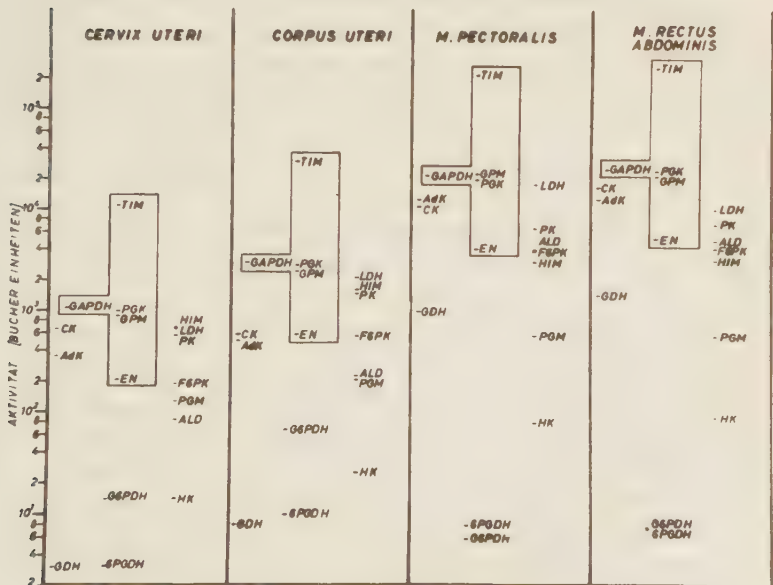


Abb. 5 : Enzymverteilungsmuster der glatten und quergestreiften Muskulatur (absolute Werte in Buchereinheiten pro g Frischgewicht).

Die PTG-Gruppe

Der BÜCHER'sche Arbeitskreis hat durch vergleichende Untersuchungen der Enzymausstattung hochdifferenzierter Muskeln der afrikanischen Wanderheuschrecke festgestellt, daß die Aktivitäten einiger Enzyme des Embden-Meyerhof-Weges konstante Proportionen aufweisen. Es konnte gezeigt werden, daß Differenzierung der Funktion und Differenzierung der Enzymmuster einander entsprechen (BROSEMER, VOGELL und BÜCHER 1963 ; PETTE und BÜCHER 1963 ; VOGELL, BISHAI, BÜCHER, KLINGENBERG, PETTE und ZEBE 1959 ; BISHAI , VOGELL und BÜCHER 1960; PETTE, KLINGENBERG und BÜCHER 1962; PETTE, LUH und BÜCHER 1962; PETTE und LUH 1962).

Fünf Enzyme des Embden-Meyerhof-Weges, die GAPDH, PGK, GPM, TIM und EN, zeigen ein konstantes Verhältnis ihrer Aktivitäten zueinander. Betrachten wir den Embden-Meyerhof-Weg, so liegen diese Enzyme in einem Abschnitt, in dem keine Verzweigungen des Kohlenhydratstoffwechsels vorliegen. Möglicherweise erklärt diese Stellung die Proportionskonstanz. BÜCHER und Mitarbeiter haben diese Enzymgruppe auf Grund der umgesetzten Substrate PTG-Gruppe (Phospho-Triose-Glycerat-Gruppe) genannt.

In Abb. 5 sind die Aktivitäten der Cervix und des Corpus uteri, sowie des M. pectoralis und des M. rectus abdominis in Form eines Aktivitätsmusters einander gegenübergestellt. Die Enzyme der PTG-Gruppe besitzen auch in den hier aufgeführten Muskeln konstante Proportionen, zeigen jedoch in ihren absoluten Aktivitäten Schwankungen um eine Zehnerpotenz. Die Cervix uteri hat die niedrigsten, die Skelettmuskulatur die höchsten Aktivitäten, während das Muster des Corpus uteri etwa in der Mitte zwischen beiden liegt und sich mit dem von SCHIMASSECK (1961) und in eigenen Untersuchungen für den Rinderpansen gefundenen Enzymmuster deckt.

Die Proportionskonstanz der PTG-Gruppe haben BÜCHER und Mitarbeiter als Beispiel einer koordinierten Kontrolle der Enzym Spiegel herausgestellt, die von JACOB and MONOD (1961) durch die Operon-Hypothese gedeutet wurde.

In Abb. 5 werden unter anderem zwei Enzyme mit spezifischen Aktivitäten, die GDH und die LDH, zur PTG-Gruppe in Beziehung gesetzt. In der Corpusmuskulatur entspricht die LDH annähernd der Aktivität der GAPDH, die GDH ist nur in Spuren nachweisbar. Die Cervix uteri zeigt einen ähnlichen Befund, die Aktivitäten liegen in diesem Gewebe um den Faktor 3 niedriger. In der quergestreiften Muskulatur ist die Aktivität der LDH im Verhältnis zur PTG-Gruppe noch höher und auch die GDH weist eine hohe Aktivität auf. Daraus ergibt sich, daß die quergestreifte Muskulatur eine höhere Potenz zur Bildung von Lactat hat. Dieses Gewebe kann demnach unter anaeroben Stoffwechselbedingungen besser arbeiten als der glatte Muskel.

Die Hexokinase

In der Hexokinase-Reaktion ($\text{Glucose} \longrightarrow \text{G6P}$) wird Glucose zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert, die Rückreaktion durch die Glucose-6-phosphatase findet im Muskel nicht statt. Welche Rolle die Hexokinase beim aktiven Transport von Glucose in die Zelle spielt, ist zur Zeit noch sehr umstritten. In einer Theorie wird die Ansicht vertreten, daß die Glucose beim Durchtritt durch die Zellmembran phosphoryliert und in der Zelle wieder dephosphoryliert wird. Nach anderen Vorstellungen besteht eine freie Permeabilität der Glucose in die Zelle und nur Glucose-6-phosphat ist limitierend für die Hexokinase-Reaktion. Im Muskel selbst findet sich unter physiologischen Bedingungen keine Glucose (HELMREICH und CORI 1959). Ein physiologischer Regulationsmechanismus der Hexokinase-Aktivität ist außerdem durch das Verhältnis ATP zu ADP in der Zelle

gegeben, da die Hexokinase für beide Nucleotide die gleiche Affinität besitzt (SOLS and CRANE 1954).

Die Hexokinase weist in der Muskulatur eine auffallend niedrige Aktivität auf. Sie ist in der quergestreiften Muskulatur nur um den Faktor 3 höher als im Corpus uteri, und in der Cervix uteri findet sich nur die Hälfte der Aktivität, die im Corpus nachgewiesen werden konnte. Die Aktivität der Hexokinase ist besonders im Verhältnis zu den Enzymen der Glycolyse auffällig niedrig. Daraus kann man schließen, daß der Muskel während der Arbeit das Glucose-6-phosphat vorwiegend aus dem intrazellulär gelagerten Glycogen beziehen muß. Diese Vorstellung wird durch den Aktivitätsspiegel der Phosphogluco-Mutase gestützt.

Die Phosphogluco-Mutase

Dieses Enzym spielt eine wesentliche Rolle im Glycogenstoffwechsel, es katalysiert die Reaktion



Es ist also in die Glycogenolysereaktion und in die Glycogen-Synthesereaktion eingeschaltet. Die hohe Aktivität der Phosphogluco-Mutase in der Muskulatur deutet darauf hin, daß die Energie für die Kontraktionsabläufe aus dem raschen Abbau des Glycogens gewonnen wird. Auch das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt stark auf Seiten des Glucose-6-phosphats, das heißt der Bereitstellung von Substrat für die Glycolyse (CORI et al. 1937 und 1938).

Die hohe Aktivität der Phosphoglucomutase im Muskel deutet darauf hin, daß Glucose-6-phosphat in erster Linie aus Glycogen gewonnen wird, bzw. daß der Muskel seine Glycogenvorräterasch mobilisieren kann, wenn durch die Muskelaktion und die dadurch bedingte Kompression der Gefäße die Zufuhr von Blutglucose unterbunden ist. Für die Glycogen-

Synthese spielt dieses Enzym ebenfalls eine wichtige Rolle. Bei der Gluconeogenese, der Neubildung von Kohlenhydraten aus anderen Metaboliten des Intermediärstoffwechsels, werden besonders Lactat, die glucoplastischen Aminosäuren, sowie Malat und Oxalacetat im Verlauf der Gluconeogenese zu Glucose-6-phosphat und durch die Phosphogluco-Mutase zu Glycogen metabolisiert.

Der Pentose-Phosphat-Cyclus

Der Pentose-Phosphat-Cyclus stellt eine Seitenkette des Embden-Meyerhof-Weges dar und hat unter anderem die Aufgabe der TPNH-Bildung. Dieses Coenzym wird im Metabolismus der Zelle für Syntheseleistungen, insbesondere die Fettsynthese benötigt. Weiterhin spielen die Metabolite des Pentose-Phosphat-Shunts als C_5 -Zucker eine Rolle beim Aufbau von Coenzymen. Beide Dehydrogenasen des Pentose-Phosphat-Shunts, das Zwischenferment (G6PDH) und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PGDH), wurden bestimmt. Die Aktivität dieser Enzyme liegt in der glatten Muskulatur deutlich höher als in der quergestreiften.

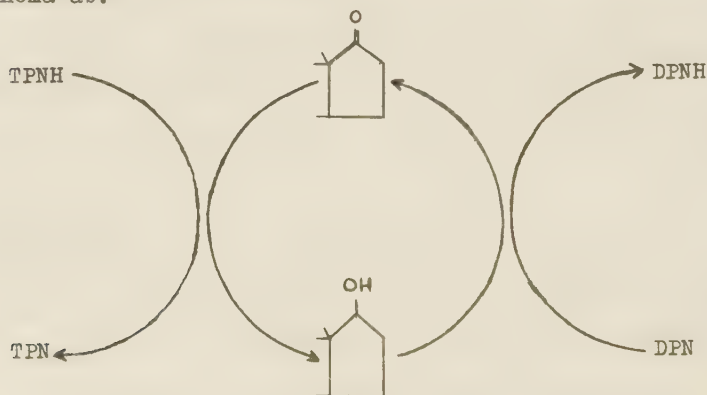
Während dieser Stoffwechselweg in der Skelettmuskulatur bilanzmäßig praktisch bedeutungslos ist, können für die höheren Aktivitäten seiner Enzyme in der glatten Muskulatur vorwiegend zwei Gründe diskutiert werden.

Die hohe Aktivität der G6PDH und der 6PGDH im Uterusmuskel findet im Tumorgewebe ein analoges Verhalten . In den Tumoren wird den Enzymen des Pentose-Phosphat-Cyclus eine wesentliche Funktion in anaeroben Stoffwechsel zugeschrieben (SCHMIDT und SCHMIDT 1960 ; DELBRÜCK et al. 1959). Die Tumoren und die glatte Muskulatur haben ebenfalls eine niedrige Aktivität der GDH gemeinsam. Es liegt hier die Überlegung nahe, ob die glatte Muskulatur in ihrer Enzymausstattung mehr einem entdifferenzierten als einem

hochspezialisierten Gewebe näher kommt.

Andererseits käme für den Muskelanteil des Uterusgewebes eine spezifische Aufgabe in Frage. Das nicht für Syntheseleistung benötigte TPNH könnte über ein Transhydrogenasesystem transhydrogeniert werden. Die Transhydrogenasen sind besonders in den Organen nachgewiesen worden, die unter der Einwirkung der Steroidhormone stehen. Dabei soll es besonders zu einer Stimulierung der G6PDH kommen. Die hohe Aktivität der G6PDH im Myometrium, einem Erfolgsorgan der Steroidhormone wäre hierdurch erklärbar (TALALAY and WILLIAMS-ASHMAN 1958 ; HAGERMANN et al. 1959 a und b).

Die Transhydrogenierungsreaktion läuft dadurch ab, daß die Steroide als Transportmetaboliten einer Oxydoreduktion unterliegen. Die Reaktion läuft nach folgendem Schema ab:



Die Transhydrogenierung wird z. B. durch eine 17- β -hydroxysteroid-Dehydrogenase katalysiert, die sowohl mit TPN als auch mit DPN als Coenzym fungiert.

Bei der Oxydation von TPNH ist der Gewinn an ATP im Verhältnis zur Oxydation von DPNH geringer.

Als Ursache wurde eingangs schon der Einfluß von Steroidhormonen auf dieses Gewebe diskutiert. Da im Uterus außer in der Gravidität keine besonderen Syntheseleistungen ablaufen, besteht die Möglichkeit, daß der Uterusmuskel die direkte Glucose-Oxydation durch den Pentose-Phosphat-Cyclus als Energiequelle ausnutzt. In Abb. 6 sind die Aktivitäten der G6-DH und der 6PGDH und der GDH in den beiden Muskeltypen vergleichsweise gegenübergestellt.

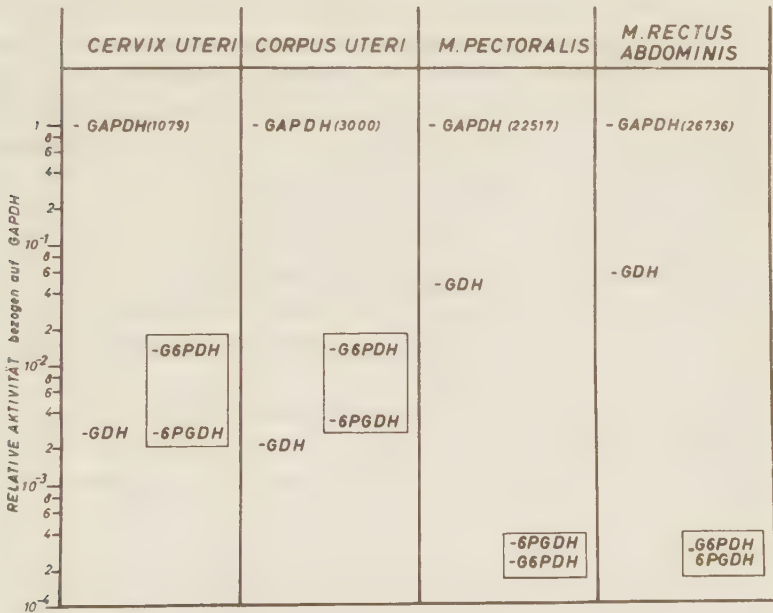
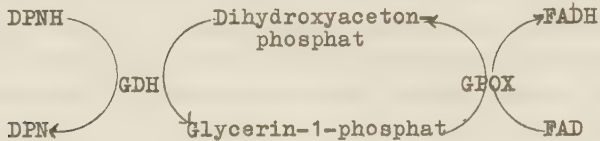


Abb. 6 : Relative Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH), der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und der Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase (GDH) im glatten und im quergestreiften Muskel bezogen auf die Aktivität der Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Aktivität in BE pro g Frischgewicht.

Der Glycerophosphat-Cyclus

Von BÜCHER und KLINGENBERG wurde der Glycerophosphat-Cyclus als Transportweg des extramitochondrialen Wasserstoffs in die Mitochondrien über das Glycerin-1-phosphat gefunden.



Im Cytoplasma wird Dihydroxyacetonphosphat durch die GDH unter Mitwirkung von DPNH als Coenzym zu Glycerin-1-phosphat umgesetzt. Dieses Substrat gelangt an das Mitochondrium und wird dort durch die strukturgebundene GPOX zu Dihydroxyacetonphosphat oxydiert. Der Wasserstoff wird über ein Flavin-nucleotid auf die Atmungskette übertragen.

Bezieht man die Aktivität der GPOX auf die Aktivität der GAPDH, so findet man ein proportionskonstantes Verhalten, dagegen zeigt die GPOX im Vergleich zur konstanten mitochondrialen Gruppe des Citrat-Cyclus (SDH und m-MDH) spezifische Proportionen. Im glatten Muskel und in Tumoren fehlt die GDH vollständig, wie SCHIMASSEK gezeigt hat. Die geringe Aktivität der GDH, die trotzdem im glatten Muskel nachgewiesen werden konnte, ist möglicherweise durch den Bindegewebsanteil bedingt.

Da infolgedessen der Glycerophosphat-Cyclus in der oben beschriebenen Weise im glatten Muskel nicht ablaufen kann, ist es nicht verwunderlich, daß hier keine Proportionskonstanz der GPOX besteht. Von PETTE (1963) wurde das konstante Verhältnis von GAPDH und GPOX beim Vergleich verschiedenster Muskeltypen regelmäßig gefunden und als Kompensationsphänomen bezeichnet. Auch im hier untersuchten M. pectoralis und M. rectus abdominis konnte das Kompensationsphänomen bestätigt werden.

Glutamat-Dehydrogenase und Transaminasen

Aus dem Aminosäurestoffwechsel wurden die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und die Glutamat-Dehydrogenase bestimmt. Die Transaminasen verbinden den Aminosäurestoffwechsel mit dem Tricarbonsäure-Cyclus. Das Glutamat kann in zwei Reaktionswegen umgesetzt werden: In Form einer oxydativen Desaminierung durch die GluDH zu Ketoglutarat oder in einer Transaminierungsreaktion durch die GOT zu Oxalacetat.

Im Enzymverteilungsmuster gehört die m-GOT zur mitochondrialen proportionskonstanten Gruppe. Die GluDH hat spezifische Proportionen. Die Aktivität der GluDH liegt im quergestreiften M. pectoralis und M. rectus abdominis sehr niedrig, ein Befund, der auch schon im Flugmuskel und im M. quadriceps der afrikanischen Wanderheuschrecke erhoben wurde. Im Uterusmuskel finden sich dagegen auffällig höhere Werte. Über eine spezielle Funktion der GluDH lassen sich nur Vermutungen anstellen.

Die relativ hohe Aktivität der GluDH im glatten Muskel ist jedoch unter einem anderen Aspekt interessant. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen über die Feinstruktur der Mitochondrien wurde das Vorkommen zweier charakteristischer Mitochondrientypen aufgedeckt. Gewebe mit hoher Aktivität mitochondrial strukturgebundener Enzyme, wie z. B. der Insektenflugmuskel, Skelett- und Herzmuskel besitzen Mitochondrien mit ausgeprägten Cristae-Strukturen (Mitochondrien vom Cristae-Typ) Diese Gewebe sind arm an GluDH.(PETTE und BRANDAU 1966)

In der Leber mit ihrer hohen GluDH-Aktivität sind die cristae mitochondriales der Mitochondrien nur wenig differenziert. In diesen Mitochondrien überwiegt die sogenannte mitochondriale Matrix (Mitochondrien vom Matrix-Typ) die elektronenmikroskopische Darstellung der Mitochondrien des glatten Muskels zeigt einen Typus, der dem

der Matrix-Mitochondrien der Leber näher kommt (BONNEVILLE, PORTER 1965). Dieser Befund gilt als typisches Beispiel der Korrelierbarkeit von strukturellen Besonderheiten und Aktivitätsmustern von Enzymen. (VOGELL, 1963)

Der Citronensäure-Cyclus

Im Citrat-Cyclus fällt als proportionskonstante Gruppe die m-MDH und die SDH auf. Die SDH als mitochondrial strukturgebundenes und nicht extrahierbares Enzym und die den leicht extrahierbaren mitochondrialen Proteinen zugehörige MDH sind in ihren physikalischen Eigenschaften grundsätzlich unterschieden. Trotzdem bilden sie, wie aus der Proportionskonstanz ihrer Aktivität ersichtlich ist, innerhalb des Citrat-Cyclus eine funktionelle Einheit. Dieser proportionskonstanten Gruppe stehen als weitere mitochondriale Enzyme die GluDH und GPOX gegenüber, die deutlich spezifische Proportionen besitzen.

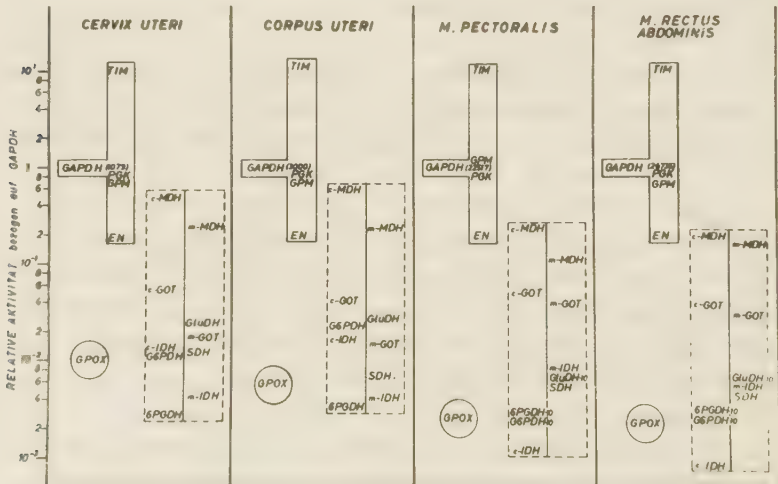


Abb. 7 : Enzymaktivitätsmuster von glatter und quergestreifter Muskulatur des Menschen. Die Aktivitäten sind auf die GAPDH bezogen , proportionskonstante Gruppen sind eingerahmt, cytoplasmatische(c-) und mitochondriale Enzyme (m-) sind getrennt aufgetragen. Aktivität pro g Frischgewicht.

Beim Vergleich der Enzymmuster dieser in ihrer Funktion so differenten Muskeltypen spiegeln sich die Funktionen in der Verschiedenartigkeit der Enzymmuster wieder. In Abb. 7 sind die Enzyme der verschiedenen Stoffwechselabschnitte und unterschiedlicher intrazellulärer Lokalisation aufgetragen und im Maßstab der relativen Aktivität angegeben. d. h. alle Enzymaktivitäten wurden auf die GAPDH bezogen. Die absolute Aktivität der GAPDH beträgt in der Cervix uteri 1079 BE, im Corpus uteri 3000 BE, im M. pectoralis 22 517 BE und im M. rectus abdominis 26 736 BE. Durch Umrandung sind in der Abbildung zwei Enzymgruppen hervorgehoben, die PTG-Gruppe und eine Gruppe cytoplasmatischer und mitochondrialer Enzyme, die ebenfalls ein proportionskonstantes Verhalten zeigen. Im quergestreiften Muskel weist die GPOX Proportionskonstanz auf, die für den glatten Muskel nicht bestätigt werden konnte.

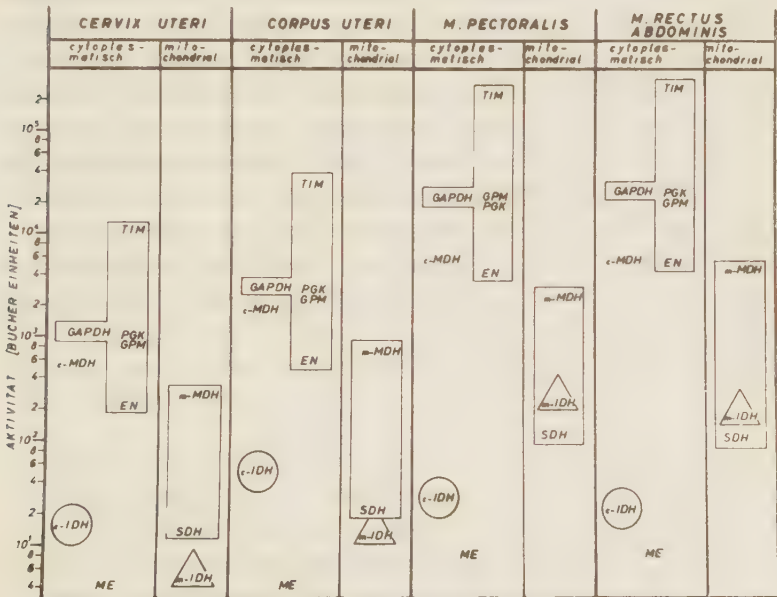


Abb. 8 : Gegenüberstellung der proportionskonstanten Gruppen cytoplasmatischer und mitochondrialer Enzyme in den untersuchten Geweben.

Die große Gruppe der cytoplasmatischen Enzyme zeigt eine proportionskonstante Beziehung zu den Enzymen des Citrat-Cyclus, zur m-MDH und zur SDH. Von den zweiörtig lokalisierten Enzymen steht nur die c-MDH in einem proportionskonstanten Verhältnis zur m-MDH und zur SDH. Die übrigen Enzyme c-GOT und m-GOT, sowie c-IDH und m-IDH weisen spezifische Proportionen auf. Betrachtet man das Verhältnis der c-IDH zur m-IDH, so fällt auf, daß beim quergestreiften Muskel eine Umkehr dieses Verhältnisses auftritt.

Die Proportionskonstanz in der Glycolyse und im Citrat-Cyclus sind Organisationsmerkmale des Stoffwechsels der Zelle. Unter diesem Aspekt sind beide Muskeltypen vergleichbar. In Abb. 8 sehen wir, daß im Uterusmuskel die Aktivität der GAPDH und der m-MDH näher aneinander liegen als im M. pectoralis. Das würde bedeuten, daß der glatte Muskel die Energie für seine tonische Funktion vorwiegend durch vollständige Verbrennung der Glucose gewinnt, während der quergestreifte Muskel seine Energie für die raschen Kontraktionsabläufe überwiegend aus der Glycolyse bezieht. Auch hierin spiegelt das Enzymmuster die Funktion der beiden Muskeltypen wieder. Durch die Systemkorrelation (PETTE 1965) läßt sich dieser Befund eindrucksvoll hervorheben. Dabei wird die Beziehung Glycolyse zu Citrat-Cyclus aus den absoluten Aktivitäten der GAPDH und m-MDH aufgestellt.

	Cervix		Corpus		M.pectoralis		M.rectis abdomin.
GAPDH	1079		3000		22517		26736
	<u> </u>	4,2	<u> </u>	4,35	<u> </u>	9,95	<u> </u>
m-MDH	255		686		2260		4290

Der niedrige Faktor im glatten Muskel bringt die Potenz zur vollständigen Oxydation des Glucosemoleküls im Metabolismus zum Ausdruck. Den hochspezialisierten schnell periodisch arbeitenden Flugmuskel der afrikanischen Wanderheuschrecke kann man in dieser Beziehung als Idealfall anführen. Hier wird die Glucose vollständig in den Citrat-Cyclus eingeschleust. In diesem Muskel gibt es

praktisch keine LDH und die Aktivität der m-MDH ist höher als die der GAPDH, so daß der Faktor der Systemkorrelation kleiner als 1 wird.

Der hohe Faktor im M. pectoralis zeigt, daß hier durch die relativ hohe glycolytische Potenz die Möglichkeit des anaeroben Glucoseabbaus im Vordergrund steht. Der M. rectus abdominis nimmt hier eine Mittelstellung ein, die auch in den anderen Darstellungen als Abweichung zum Ausdruck kommt. Betrachtet man die Funktion des M. rectus abdominis, so hat er vorwiegend Haltearbeit zu leisten und kommt somit der glatten Muskulatur näher.

Nach Untersuchungen von DUBOWITZ und PEARSE (1960 und 1961) soll die Skelettmuskulatur des Menschen aus weißen und roten Muskelfaseranteilen bestehen, nur das Mischungsverhältnis soll schwanken. PETTE (1963) stellte bei biochemischen Untersuchungen des roten, tonischen und des weißen, tetanischen Muskels der hinteren Extremität des Kaninchens fest, daß beim weißen Muskel die Ausrüstung mit glycolytischen Enzymen überwiegt, während beim roten Muskel ein ausgewogeneres Verhältnis zwischen Glycolyse und Citrat-Cyclus besteht, und die Potenz zur vollständigen Verbrennung des Glucosemoleküls stark ausgeprägt ist. Geht man von diesen Befunden aus, so könnte man vermuten, daß im M. rectus abdominis das Mischungsverhältnis zwischen roten und weißen Fasern zugunsten der roten verschoben ist. Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, hier eine Klärung herbeizuführen.

Malic Enzyme

Ein anderes Enzym mit Spezialaufgaben stellt das Malic-Enzyme (ME) dar, es katalysiert folgende von OCHOA (1948) beschriebene Reaktion:



Zusammen mit der UTTER-Reaktion (1954), die über Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat führt, wird dieser Weg bei der Gluconeogenese besprochen.

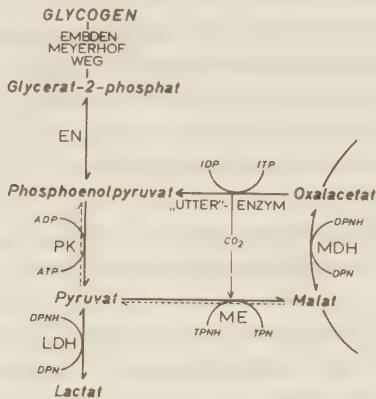


Abb. 9: Darstellung des Stoffwechsels von Pyruvat zum Phosphoenolpyruvat über das Malic-Enzyme und das "UTTER"-Enzyme.

Die niedrige Aktivität des ME spricht dafür, daß die Reaktion der Gluconeogenese im Muskel nicht abläuft. Die Leber dagegen, deren Aufgabe als Glycogen-synthetisierendes Organ bekannt ist, weist Aktivitäten des ME auf, die um eine Größenordnung höher liegen. Wie von CORI und CORI bewiesen wurde, wird auch im quergestreiften Muskel das anfallende Lactat auf dem Blutwege zur Leber transportiert und dort zu Glucose resynthetisiert, welche dann als neuer Brennstoff auf dem Blutwege dem Muskel zugeführt werden kann. Dieser sogenannte CORI-Cyclus muß anhand der niedrigen ME-Aktivität der Uterusmuskulatur auch für diesen glatten Muskel angenommen werden.

Neben der Aufgabe im Ablauf der Gluconeogenese wird für das ME die Aufgabe eines Hilfsenzym für den Citrat-Cyclus diskutiert (PETTE 1965; BRANDAU und PETTE 1966)

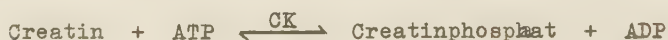
Das in der ME-Reaktion gebildete Malat würde in diesem Fall in die Mitochondrien eingeschleust, über die m-MDH zu Oxalacetat oxydiert werden und stünde dann als Acceptor für das angelieferte Acetyl CoA zur Verfügung. Die funktionelle Bedeutung des ME für den Citrat-Cyclus wäre demnach in der Inangangsetzung und Stabilisierung des Tricarbonsäure-Cyclus zu sehen.

Beim Vergleich verschiedener Muskeltypen der afrikanischen Wanderheuschrecke zeigten sich als Bestätigung dieser Vorstellung konstante Proportionen zwischen Malic Enzyme und der Gruppe der Enzyme des Citrat-Cyclus. Im *M. pectoralis* und *M. rectus abdominis* findet sich zwar diese Proportionskonstanz, läßt sich aber im Uterusmuskel nicht nachweisen. Die diskutierte Funktion des ME wird dadurch jedoch nicht ausgeschlossen.

Phosphocreatin-Kinase und Myokinase

Als spezifische Enzymausstattung des Muskelgewebes verdient die Phosphocreatin-Kinase und die Myokinase besondere Beachtung. Aus den vorangegangenen Untersuchungen wissen wir, daß die Energie für die Muskelkontraktion durch die Glycolyse des Muskelglycogens gewonnen wird. Für die rasche Bereitstellung der Energie zu den energieverbrauchenden Vorgängen der Kontraktion steht der pool der energiereichen Phosphate Creatinphosphat und Adenosintriphosphat zur Verfügung (WEBER 1956). Nach den Untersuchungen von MEYERHOF (1927) beträgt der Energiegehalt der Phosphatbindung in Creatinphosphat 11000-12000 cal/mol. Die Umsetzung dieser chemischen Energie in mechanische Energie wird in verschiedenen Theorien über die Kontraktionsvorgänge der Muskulatur diskutiert. Dabei wird die Rolle der energiereichen Phosphate als Energiespender in allen Theorien vertreten. LUNDGAARD (1930) konnte zeigen, daß nach Blockierung der Resynthese von Creatinphosphat

durch Monojodacetat 50 - 100 Kontraktionen möglich sind. Diese Energie kann nur dem in der Zelle vorhandenen Creatinphosphat entstammen. Die Freisetzung der Energie des Creatinphosphats erfolgt indirekt, wie LOHMANN (1934) zeigen konnte, und kann nur stattfinden, wenn ADP als Acceptor-molekül zur Verfügung steht. Das so entstandene ATP wird dann direkt im Kontraktionsvorgang umgesetzt. Durch Untersuchung der Aktivitäten der intrazellulär lokalisierten Phosphotransferasen bekommt man einen Einblick in den Metabolismus der energiereichen Phosphate in der Muskulatur. Durch die Creatin-Kinase wird folgende Reaktion katalysiert:



Diese Reaktion gewährleistet die Konstanz des ATP-Spiegels in der Muskelzelle, da sie kurzfristig ohne Ablauf der Glycolyse die Resynthese von ATP ermöglicht. In der Arbeitspause des Muskels kommt es dann zur Resynthese von Creatinphosphat aus dem durch Glycolyse und aus Atmungskettenphosphorylierung bereitgestellten ATP.

Für vorübergehenden ATP-Mangel kann die Myokinase-Reaktion bedeutsam werden. Die Reaktion



ist reversibel, die nach links verlaufende Reaktion führt zur Bereitstellung von ATP. Ebenso kann die Reaktion zur Bildung von ADP aus Adenylsäure herangezogen werden. AMP wird zu ADP und kann dann durch eine mit der Glycolyse gekoppelte Phosphorylierung zu ATP überführt werden.

Die fraktionierte Extraktion zeigt, daß etwa 97 % der Aktivität der Phosphokreatin-Kinase im extramitochondrialen Raum und 3 % in den Mitochondrien der quergestreiften Muskulatur lokalisiert sind. Diese Befunde stimmen mit denen von JACOBS überein, der in isolierten Mitochondrien tierischer

Skelettmuskulatur Creatin-Kinase und Creatinphosphat nachweisen konnte. Die mitochondriale Lokalisation von Creatin-Kinase hat ihre physiologische Bedeutung vermutlich darin, daß nach der Atmungskettenphosphorylierung ATP zu Creatinphosphat transphosphoryliert wird. Creatinphosphat diffundiert zu den Myofibrillen und kann dort wieder ATP bilden. (KLINGENBERG 1964)

Die Phosphokreatin-Kinase des Myometriums ist zu 100 % cytoplasmatisch lokalisiert. Die Aktivität der Myokinase ist in beiden Muskeltypen ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert, da ein Nachweis an Aktivitäten dieses Enzyms in Mitochondrien nicht erbracht werden konnte.

BENDALL (1952, 1954) hielt die Myokinasereaktion für identisch mit dem Erschlaffungsfaktor von MARSH (1952). Dieser Faktor ist an korpuläre Elemente gebunden und sedimentiert zwischen 20 000 und 80 000 g und kann auf Grund der hier geschilderten Untersuchungen nicht mit der Myokinase-reaktion identisch sein.

Bei der Gegenüberstellung der Aktivität der Phosphocreatin-Kinase und Myokinase der Skelettmuskulatur und des Myometriums (Tabellen 3 und 4) finden wir eine 20 bis 30-fach höhere Aktivität der CK der quergestreiften Muskulatur und eine 25 fach höhere Aktivität der Myokinase gegenüber der glatten Muskulatur. Diese Unterschiede haben wir bereits bei den Enzymen der Glycolyse gefunden. Wenn man den Kontraktionsablauf im glatten Muskel betrachtet, sollten diese Ergebnisse nicht allzusehr verwundern, da für die Haltearbeit der glatten Muskulatur ein geringerer Energiebedarf besteht. Die Cervix uteri zeigt eine relativ höhere Aktivität der CK bei einer Erniedrigung der Aktivität der Myokinase. Die energetische Versorgung ist offenbar ohne diese Reaktion ausreichend gesichert.

S c h l u s s b e m e r k u n g

P. GREENSTEIN äußerte im Jahre 1954 in seiner "Biochemistry of Cancer" folgenden Gedanken:

- " The metabolic pattern is as distinguishing a feature of each tissue as is the gross or microscopic morphology and constitutes a functional characterisation of the tissue."
- " Quantitatively the distribution of the enzymes varies in each of the tissue, and it is this quantitative distribution which constitutes the individual mosaic of each tissue."

Es war die Absicht dieser Arbeit, durch Gegenüberstellung der quantitativen Unterschiede in der Enzymausstattung der Uterus- und Skelettmuskulatur einen Einblick in die unterschiedlichen Funktionen dieser Muskeltypen zu gewinnen und damit einen Beitrag zu einer " biochemischen Histologie " zu liefern.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Vergleichende morphologisch enzymatische Untersuchungen haben gezeigt, daß die Enzymausrüstung einiger Gewebe eine funktionsgemäße Differenzierung aufweisen. Für das Myometrium liegen derartige Untersuchungen nicht vor.

Um die Beziehungen zwischen Funktion und Enzymmuster im Myometrium zu erfassen, wurden im Corpus uteri und in der Cervix uteri nicht schwangerer, geschlechtsreifer Frauen die Aktivitäten von Enzymen des Embden - Meyerhofweges, des Citronensäure-Cyclus, des Pentosephosphat-Shunts, des Glycerophosphat-Cyclus und des Glycogen- und Aminosäurestoffwechsels bestimmt und den Aktivitäten dieser Enzyme in der quergestreiften Muskulatur (M. rectus abdominis und M. pectoralis) gegenübergestellt.

Durch fraktionierte Extraktion werden die extra- und intramitochondrialen Enzyme der Uterus- und Skelettmuskulatur getrennt extrahiert. Im extramitochondrialen, cytoplasmatischen Raum wurden die Enzyme der Glycolyse und des oxydativen Glucoseabbaus gefunden: Phosphoglucose-Mutase, Hexokinase, Hexosephosphat-Isomerase, Fructose-6-phosphat-Kinase, Aldolase, Triosephosphat-Isomerase, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Glycerat-phosphat-Mutase, Enolase, Pyruvat-Kinase, Lactat-Dehydrogenase, sowie die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase und das Malic Enzyme, sowie die cytoplasmatischen Anteile der zweiörtig lokalisierten Enzyme Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase, Isocitrat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase.

Die Glycerin-1-phosphat-Oxydase und die Succinat-Dehydrogenase wurden in beiden Muskeltypen als streng mitochondrial lokalisierte Enzyme nachgewiesen. Auch die Glutamat-Dehydrogenase des quergestreiften Muskels ist ausschließlich mitochondrial lokalisiert. Die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Malat-Dehydrogenase und die Triphosphopyridinnucleotid-spezifische Isozitat-Dehydrogenase wurden in beiden Muskelarten sowohl intra- als auch extramitochondrial lokalisiert gefunden.

Die absoluten Aktivitäten der Enzyme des Embden-Meyerhof-Weges liegen im M. rectus abdominis um den Faktor 7 - 9 höher als im Corpus uteri. Die Bedeutung dieses Befundes für die schnelle Bereitstellung von Energie für die rasch erfolgenden Bewegungsabläufe der quergestreiften Muskulatur wird erörtert.

Die Enzyme des Pentosephosphat-Cyclus wiesen im Myometrium eine 14-fach höhere Aktivität auf als in der Skelettmuskulatur. Die Rolle der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase als TPN-Regeneratoren wird diskutiert.

Im Glycerophosphat-Cyclus der glatten Muskulatur wurden nur Spuren der Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase gefunden. Dieser Befund stellt eine spezifische Eigenart der glatten Muskulatur und der Tumoren dar, während in der Skelettmuskulatur die Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase in einer 180-fach höheren Konzentration nachweisbar war. Die Glycerin-1-phosphat-Oxydase ist dagegen im quergestreiften Muskel nur um den Faktor 3 - 4 höher als im glatten Muskel.

Die Enzymausstattung des Tricarbonsäure-Cyclus ist in der Skelettmuskulatur dreimal so hoch wie in der glatten Muskulatur und wird unter dem Aspekt der vollständigen Verbrennung des Glucosemoleküls für die tonische

Funktion des glatten Muskels diskutiert und in Beziehung zur weit höher ausgebauten Fähigkeit zum raschen Ablauf der Glycolyse im Skelettmuskel gesetzt.

Bei Untersuchung der Enzyme des Aminosäurestoffwechsels konnte im Uterusmuskel keine Glutamat-Pyruvat-Transaminase nachgewiesen werden, während der Skelettmuskel eine relativ hohe Aktivität dieses Enzyms aufweist. Die Aktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase liegt im Skelettmuskel 10 - 14-fach höher als im Myometrium. Die Glutamat-Dehydrogenase als mitochondriales Enzym konnte in der glatten Muskulatur mit 9-fach höherer Aktivität zu etwa 40 % im Cytoplasma nachgewiesen werden.

Die Aktivitäten der Phosphotransferasen liegen im quergestreiften Muskel um den Faktor 20 - 30 höher als im Uterusmuskel. Ihre besondere Bedeutung für die Speicherung und Bereitstellung des energiereichen Phosphats für den Kontraktionsvorgang wird diskutiert.

In der Skelettmuskulatur konnte die Phospho-Creatin-Kinase intra- und extramitochondrial nachgewiesen werden, während sie in der glatten Muskulatur nur cytoplasmatisch lokalisiert war. Die Enzymausstattung der Cervix beträgt etwa ein Drittel der Aktivitäten des Corpus mit Ausnahme der Phosphotransferasen, die in diesen beiden Abschnitten des Uterus mit ungefähr gleich hoher Aktivität nachweisbar waren. Es ist deshalb anzunehmen, daß auch darin eine funktionelle Besonderheit der Cervix zum Ausdruck kommt.

Das Phänomen der proportionskonstanten Gruppe einiger Enzyme der Glycolyse und des Citratcyclus konnte auch für die glatte Muskulatur bestätigt werden.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Amberson, W.R., A.C. Bauer, D.E. Philpott and A. Roison: Proteins and enzyme activities of press juices, obtained by ultracentrifugation of white, red and heart muscle of the rabbit.
J. cell. comp. Physiol. 63, 7 (1964)
2. Banga, J. and A. Szent Györgyi: Adenosinetriphosphatase.
Science (Lancaster) 93, 158 (1941)
3. Bauer, A.C., D. Pette, F. Roisen and W.R. Amberson: Binding of Aldolase by rabbit muscle ultrastructure.
Fed. Proc. 23, 310 (1964)
4. Beisenherz, G., J.H. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt und G. Pfeleiderer: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase und Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)
5. Bendall, J.R. : A factor modifying the shortening response of muscle fibre bundles to ATP.
Proc. roy. Soc. London 139, 523 (1952 a)
6. Bendall, J. R. : Effect of the Marsh Factor on the shortening of muscle fibre models in the presence of Adenosintriphosphat.
Nature 170, 1058 (1952b)
7. Bendall, J.R. : Myokinase as a relaxing factor in muscle.
Nature 173, 548 (1954 a)
8. Bendall, J.R. : The relaxing effect of Myokinase on muscle fibres; its identity with the Marsh Factor.
Proc. roy. Soc. London 142, 409 (1954 b)
9. Bishai, F.R., W. Vogell und Th. Bücher: Über die Ausbildung des spezialisierten histologischen und enzymatischen Musters des Flugmuskels von Locusta migratoria.
Europ. Symp. med. Enzymol., Mailand (1960)

10. Born, G.V.R. and A. Bülbbring: The movement of potassium between smooth muscle and the surrounding fluid.
J. Physiol. 131, 690 (1956)
11. Brandau, H. and D. Pette: Topische Muster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels im quergestreiften Muskel.
Enzymol. biol. Clin. 6, 123 (1966)
12. Brosemer, R.W., W. Vogell und Th. Bücher : Morphologische und enzymatische Muster bei der Entwicklung indirekter Flugmuskeln von Locusta migratoria.
Biochem. Z. 338, 854 (1963)
13. Bücher, Th. und M. Klingenberg: Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation .
Angew. Chem. 70, 552 (1958)
14. Bücher, Th. : Redoxbeziehungen des Glycerophosphat.
S.-B. Ges. Beförd. ges. Naturwiss. 86, 383 (1962)
15. Bücher, Th. : Enzyme unter biologischem Aspect.
In: " Erbliche Stoffwechselkrankheiten " Hrsgb. F. Linneweh, München-Berlin 1962
16. Bücher, Th. : The co-ordination of chemical processes in the living cell.
J. internat. Union of pure and applied Chem. 6, 209 (1963)
17. Bücher, Th., W. Luh und D. Pette : Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden.
Hdb. Hoppe-Seyler-Thierfelder 10. Auflage Bd. IV/A, S. 292 (1964)
18. Bülbbring, E. : Die Physiologie des glatten Muskels.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 273, 1 (1961)
19. Cori, C.F., S.P. Colowick and G.T. Cori : The isolation and synthesis of Glucose-1-phosphoric acid.
J. biol. Chem. 121, 465 (1937)
20. Cori, G.T., S.P. Colowick and G.F. Cori : The enzymatic conversion of Glucose-1-phosphoric ester to -6-ester in tissue extracts.
J. biol. Chem. 124, 543 (1938)
21. Crane, R.K. and A. Sols : The association of Hexokinase with particulate functions of brain and other tissue homogenates.
J. biol. Chem. 203, 273 (1953)

22. Cretius, K. : Über den wechselnden Gehalt des menschlichen Uterusmuskels an kontraktile Proteinen.
Gynaecologia 143, 192 (1957)
23. Cretius, K. : Untersuchungen des Adenosintriphosphorsäure-, Adenosindiphosphorsäure- und Adenosin-5'-monophosphorsäure-Gehaltes menschlicher Skelett- und Uterusmuskulatur.
Z. Geburtsh. Gynäk. 149, 131 (1958 a)
24. Cretius, K. : Der Kreatinphosphatgehalt menschlicher Skelett- und Uterusmuskulatur.
Z. Geburtsh. Gynäk. 149, 113 (1958 b)
25. Cretius, K. : Untersuchungen zum Elektrolytgehalt der menschlichen Uterusmuskulatur.
Arch. Gynäk. 192, 531 (1960)
26. Cretius, K. und K. Beyermann : Weitere Untersuchungen zum Kationengehalt der menschlichen Uterusmuskulatur unter Anwendung mikroanalytischer Methoden.
Zbl. Gynäk. 83, 165 (1961)
27. Cretius, K. : Zum Elektrolytgehalt der menschlichen Uterusmuskulatur.
Ber. III. Weltkongr. Gynäk.-Gebh., Wien 1961
28. Czok, R. und Th. Bücher: Crystallized enzymes from Myogen of rabbit skeletal muscle.
Adv. Prot. Chem. 15, 315 (1961)
29. Davies, D.D. and E. Kun : Isolation and properties of Malic-Dehydrogenase from ox-Heart mitochondria.
Biochem. J. 66, 307 (1957)
30. Delbrück, W., H. Schimassek, K. Bartsch und Th. Bücher: Enzymverteilungsmuster in einigen Organen und in experimentellen Tumoren der Ratte und der Maus.
Biochem. Z. 331, 297 (1959)
31. Delbrück, A., E. Zebe und Th. Bücher : Über das Verteilungsmuster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper von Locusta migratoria und ihre cytologische Zuordnung.
Biochem. Z. 331, 273 (1959)
32. Dubowitz, V. and A.G.E. Pearse : Oxydative Enzymes and Phosphorylase in central core disease of muscle.
Lancet 23, 24 (1960)

33. Dubowitz, V. and A.G.E. Pearse: Reciprocal relationship of phosphorylase and oxydative enzymes in scelettal muscle.
Nature 185, 701 (1960)
34. Dubowitz, V. and A.G.E. Pearse : A comparative histochemical study of oxydative enzymes and phosphorylase activity in scelettal muscle.
Histochemie 2, 105 (1960)
35. Dubowitz, V. and A.G. E. Pearse: Enzymatic activity of normal and dystrophic human muscle.
J. Path. Bact. 81, 365 (1961)
36. Dubrausky, V. : Wieviel Muskulatur enthält die Gebärmutter.
Geburtsh. Frauenh. 22, 1022 (1962)
37. Greenstein, J.P. : Biochemistry of Cancer.
Acad. Press, New York , 1954
38. Hagermann, D.D., and C.A. Villee : Separation of human placental estrogen-sensitive transhydrogenase from estradiol-17 β -dehydrogenase.
J. biol. Chem. 234, 2031 (1959)
39. Hagermann, D.D., C.A. Villee and F.M. Wellington: Separation of human placental estrogen-sensitive transhydrogenase from estradiol-17 β -dehydrogenase.
Fed. proc. 18, 240 (1959)
40. Hasselbach, W. und G. Schneider : Der L-Myosin- und Aktiningehalt des Kaninchenmuskels.
Biochem. Z. 321, 462 (1961)
41. Hasselbach, W.: Die kontraktile Strukturen der Uterusmuskulatur und ihre Besonderheiten.
Arch. Gynäk. 202, 23 (1965)
42. Hasselbach, W. und O. Ledermair : Der Kontraktionscyclus der isolierten kontraktile Strukturen und seine Besonderheiten.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 267 532 (1958)
43. Hodgkin, A.L. and B. Katz : The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid.
J. Physiol. 108, 37 (1949)
44. Jacob, F. and J. Monod : Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins.
J. molec. Biol. 2, 318 (1961)
45. Jacobs, H. und H.W. Heldt : in Vorbereitung

46. Jaisle, F. : Tropomyosin in der menschlichen Uterusmuskulatur.
Arch. Gynäk. 194, 277 (1960)
47. Jung, H.: Die Bedeutung der Natrium-Leitfähigkeit der Uterusmuskelzelle für den Geburtsbeginn.
Arch. Gynäk. 191, 224 (1958)
48. Keynes, R.D. : The ionic movements during nervous activity.
J. Physiol. 114, 119 (1951)
49. Klingenberg, M. : Muskelmitochondrien.
Ergebn. Physiol. 55, 131 (1964)
50. Klingenberg, M. und Th. Bücher : Biological Oxydation.
Ann. Rev. Biochem. 29 229 (1960)
51. Kuschinsky, G. and F. Turba : Methode zur quantitativen Messung von Zustandsänderungen des Aktomyosins,
Biochem. Z. 321, 39 (1950)
52. Lohmann, K. : Über die enzymatische Aufspaltung der Kreatinphosphorsäure, zugleich ein Beitrag zur Muskelkontraktion.
Biochem. Z. 271, 264 (1934)
53. Luh, W. : Enzymologische Studien am normalen menschlichen Endometrium.
Habilitationsschrift, Med. Fakultät, Kiel 1965
54. Lundsgaard, E. : Untersuchungen über Muskelkontraktionen ohne Milchsäurebildung.
Biochem. Z. 217, 161 (1930 a)
55. Lundsgaard, E. : Über die Energetik der anaeroben Muskelkontraktion.
Biochem. Z. 233, 322 (1931)
56. Lundsgaard, E. : Weitere Untersuchungen über Muskelkontraktionen ohne Milchsäurebildung.
Biochem. Z. 227, 51 (1930 b)
57. Marsh, B.B. : The effect of adenosintriphosphate on the fibre volume of a muscle homogenate.
Biochem. biophys. Acta 2, 247 (1952)
58. Monod, J. : Remarks on the mechanism of enzyme induction
In: "Enzymes: Units of biological structure and function." New York 1956
59. Monod, J. : Biosynthese eines Enzyms : Information, Induction, Repression.
Angew. Chemie. 71, 685 (1959)

60. Needham, D.M. and J.M. Williams : Some properties of Uterus actomyosin and Myofilaments.
Biochem. J. 73, 171 (1959)
61. Ochoa, S., A.H. Mehler and A. Kornberg : Biosynthesis of decarboxylic acids by carbon dioxide fixation. I. Isolation and properties of an enzyme from pigeon liver catalyzing the reversible oxydative decarboxylation of L-Malic acid.
J. biol. Chem. 174, 979 (1948)
62. Pette, D., R. Czok und W. Vogell : unveröffentlicht
63. Pette, D., W. Luh und Th. Bücher : A constant proportion group in the enzyme activity pattern of the Embden-Meyerhof chain.
Biochem. biophys. res. Comm. 7, 419 (1962)
64. Pette, D., M. Klingenberg und Th. Bücher : Comparable and specific proportions in the mitochondrial enzyme activity pattern.
Biochem. biophys. Res. Comm. 7, 425 (1962)
65. Pette, D. and W. Luh : Contant-proportion groups of multilocalized enzymes.
Biochem. biophys. Res. Comm. 8, 283 (1963)
66. Pette, D. und Th. Bücher : Proportionskonstante Gruppen In Beziehung zur Differenzierung der Enzymaktivitätsmuster von Skelettmuskeln des Kaninchens.
Z. Physiol. Chem. 331, 180 (1963)
67. Pette, D. : Plan und Muster im zellulären Stoffwechsel.
Naturwiss. 52, 597 (1965)
68. Pette, D. und H. Brandau : Enzym-Histogramme und Enzymaktivitätsmuster der Rattenleber. Nachweis Pyridinnucleotid spezifischer Dehydrogenasen im Gelschicht-Verfahren.
Enzymol. Biol. Clin. 6, 79 (1966)
69. Pette, D., R.W. Brosemer und W. Vogell : in Vorbereitung
70. Porter, K.R. und A.M. Bonneville : Einführung in die Feinstruktur von Zellen und Geweben.
Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1956
71. Rhode, K. L. : Über enzymatische Muster im indirekten Flugmuskel, Extensor und Flexor tibiae von Locusta migratoria bei fraktionierter Extraktion.
Dissertation, Med. Fakultät Marburg 1963
72. Robinson, H.W. and C.G. Hodgen : The Biuret Reaction in the determination of serum proteins.
J. biol. Chem. 135, 727 (1940)

73. Schimassek, H.: Enzymatische Analyse der glatten Muskulatur im Vergleich zu anderen Muskelgeweben unter dem Aspekt der embryologischen Zuordnung. Biochem. Z. 333, 463 (1961)
74. Schmidt, E. und F.W. Schmidt: Enzymmuster menschlicher Gewebe. Klin. Wschr. 38, 957 (1960)
75. Schramm, G. und H.H. Weber: Über monodisperse Myosinlösungen. Kolloid. Z. 100, 242 (1942)
76. Schwalm, H., K. Cretius und G. Lange: Die kontraktile Proteine (Aktin-Myosin) im Uterusmuskel. Arch. Gynäk. 185, 527 (1955)
77. Schwalm H. und K. Cretius: Über den Gehalt der menschlichen Uterusmuskulatur an kontraktile Proteinen, an wasserlöslichen Proteinen und an Stromaproteinen. Arch. Gynäk. 191, 217 (1958)
78. Sols, A. and R. Crane: The inhibition of brain hexokinase by adenosindiphosphate and sulphydryl reagents. J. biol. Chem. 206, 925 (1954)
79. Sols, A. : The hexokinase activity of the intestinal mucosa. Biochem. biophys. Acta 19, 144 (1956)
80. SzéttGyörgyi, A. : The chemistry of muscular contractions. Acad. Press , New York 1950
81. Talalay, P. and H.G. Williams-Ashman: Active and hydrogen transfer between pyridin nucleotids by steroid hormones. Proc. nat. acad. Sci. 44, 15 (1958)
82. Utter, M.F. , K. Kurahashi and I.A. Rose: Some properties of oxalacetic carboxylase. J. biol. Chem. 207, 803 (1954)
83. Utter, M.F. and K. Kurahashi: Mechanism of action of oxalacetic carboxylase. J. biol. Chem. 207, 821 (1954) a
84. Utter, M.F. and K. Kurahashi: Mechanism of purification of oxalacetic carboxylase from chicken liver. J. biol. Chem. 207, 787 (1954) b

85. Vogell, W., F.R. Bishai, Th. Bücher, M. Klingenberg, D. Pette und E. Zebe: Über strukturelle und enzymatische Muster im Muskel von *Locusta migratoria*.
Biochem. Z. 332, 91 (1959)
86. Vogell, W. : Struktur und funktionelle Biochemie der Mitochondrien. I. Die Morphologie der Mitochondrien.
Konf. Ges. Dtsch. Naturforscher und Ärzte Rottach-Egern 1962
Springerverlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963
87. Warburg, O., W. Christian und A. Griese: Wasserstoff-Übertragendes Coferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise.
Biochem. Z. 282, 157 (1935)
88. Warburg, O. und W.S. Christian: Pyridin, das wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten (Pyridin-Nucleotide).
Biochem. Z. 287, 291 (1936)
89. Warburg, O.: Chemische Konstitution von Fermenten.
Ergebn. Enzymforsch. 7, 210 (1938)
90. Weber, H.H.: Der Feinbau und die mechanischen Eigenschaften des Myosinfadens.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 235, 205 (1934)
91. Weber, H.H. : Die beiden Fundamentalmechanismen der Bewegung der Lebewesen.
Dtsch. Z. Nervenheilk. 173, 392 (1955)
92. Weber, H.H.: Die Rolle des Adenosintriphosphats und die Kontraktions- und Erschlaffungsphase der Bewegung von Muskeln und Zellen.
Nova Acta Leopoldina N.F. 25, (1962)
93. Weichselbaum, C.T.E.: An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood, serum and plasma.
Amer. J. clin. Path. Techn. Sc. 10, 40 (1946)

Herrn Professor Dr. med. H. Huber danke ich
aufrichtig für die Überlassung des Themas.
Weiter gilt mein Dank Herrn Dozent Dr. W. Luh
für wertvolle Hinweise bei der praktischen
Durchführung der Arbeit und die Bereitstellung
des Arbeitsplatzes in seinem Laboratorium.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

An der Philipps-Universität Marburg:

Beckmann, Berendes, Braun-Falco, Bücher, Dimroth, du Mensil de Rochemont, Exner, Gedigk, Golenhofen, Græbe, Hartmann, Hildebrandt, Hensel, Hornung, Huber, Jacob, Kessler, Linneweh, Mahr, Martini, Mattes, Neubauer, Niessing, Overbeck, Oksche, Petry, Poetschke, Rohen, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmitz, Schölmerich, Schultze, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Straub, Vogell, Walcher, Wendt, Würterle.

An der Universität Innsbruck:

Asperger, Baumgartner, Hittmair, Holzer, Huber, Konzett, Lang, Leubner.

An der Universität Freiburg:

Büchner, Creutzfeld, Faust, Göpfert, Göppert, Haas, Hahn, Heilmeyer, Heiss, Hummel, Nötzel, Schirmeister, Schumacher.

Lebenslauf

Am 3.1.1938 wurde ich als Sohn des Försters Ewald Henkel und seiner Ehefrau Else, geborene Herrmann in Marburg geboren. Die Reifeprüfung bestand ich am 7.3.1959 an der August Vilmar Schule in Homburg Bezirk Kassel. Im Sommersemester 1959 begann ich mit dem Medizinstudium an der Philipps-Universität in Marburg, wo ich am 7.3.1960 die naturwissenschaftliche und am 26.10.1961 die ärztliche Vorprüfung bestand. Im Wintersemester 1961/62 studierte ich in Innsbruck, im Sommersemester 1962 in Freiburg und kehrte danach wieder an die Universität Marburg zurück. Am 26.2.1962 bestand ich vor dem Prüfungsausschuss der Universität Marburg das medizinische Staatsexamen.

